



Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

**«Ατομικές διαφορές στην απόκριση σε στρες»**

**Τσιαντής Χρήστος-Ορέστης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σύρρου Μαρίκα

Ιωάννινα 2024





Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Σχολή Επιστημών Υγείας

Τμήμα Ιατρικής

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης (ΜΔΕ)

**«Ατομικές διαφορές στην απόκριση σε στρες»**

**Τσιαντής Χρήστος-Ορέστης**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σύρρου Μαρίκα

Ιωάννινα 2024

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)».

Όνοματεπώνυμο: Χρήστος-Ορέστης Τσιαντής

Τίτλος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης:  
«Ατομικές διαφορές στην απόκριση σε στρες»

Ημερομηνία παρουσίασης: 23/02/2024

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής  
Γενετικής

Εξεταστική Επιτροπή:

1. Σύρρου Μαρίκα, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής
2. Αγγελίδης Χαράλαμπος, Ομότιμος Καθηγητής Γενικής Βιολογίας
3. Βεζυράκη Πατρώνα, Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας

## Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Γενικής Βιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (BBE)». Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια κ. Μαρίκα Σύρρου, Καθηγήτρια Γενικής Βιολογίας-Ιατρικής Γενετικής για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του ερευνητικής της ομάδας, τις γνώσεις που μου μετέδωσε κατά την διάρκεια των σπουδών μου αλλά και τις συμβουλές και την καθοδήγηση της καθ' όλη την διάρκεια της μεταπτυχιακής διατριβής. Θέλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες και στα άλλα δύο μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Ομότιμο Καθηγητή Γενικής Βιολογίας κ. Χαράλαμπο Αγγελίδη και την Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας κ. Πατρώνα Βεζυράκη, για την ευκαιρία που μου έδωσαν να παρακολουθήσω το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών, να εμπλουτίσω τις γνώσεις μου και να αποκτήσω πολύτιμα εφόδια. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής Βιολογίας για το φιλικό και ευχάριστο κλίμα συνεργασίας. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Δρ. Ζωή Παπαδοπούλου, η οποία ξεκίνησε αυτή την μελέτη στα πλαίσια της διδακτορικής της διατριβής και ήταν πάντα πρόθυμη να λύσει τις απορίες μου, καθώς και τους Δρ. Ανδρέα Πάμπανο, υπεύθυνο του Τμήματος Γενετικής του ΓΝΑ «Αλεξάνδρα», κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο, Παιδίατρο-Νεογνολόγο, και κ. Άντρια Σπαθή για την συλλογή των δειγμάτων. Οφείλω επίσης να ευχαριστήσω και τα μέλη των Εργαστηρίων Βιολογικής Χημείας, Φαρμακολογίας και Φυσιολογίας για την παροχή του υλικοτεχνικού εξοπλισμού των εργαστηρίων τους όποτε αυτό ήταν απαραίτητο καθώς και την βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε την χρειάζομαι. Ακόμα, ευχαριστώ πολύ την Δρ. Μιχαέλα Φίλιου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοχημείας στο Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών καθώς και την Δρ. Μαριάντζελα Βλαίκου για την πολύτιμη βοήθεια τους στα πειράματα που αφορούσαν την μελέτη του αριθμού αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA. Οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στα μέλη του Εργαστηρίου Βιολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου για την φιλοξενία στο εργαστήριο για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ανάλυσης της μεθυλίωσης. Ιδιαίτερα θέλω να ευχαριστήσω την Επίκουρη Καθηγήτρια Αργυρώ Σγουρού και την Δρ. Βασιλική Χονδρού, για την εκμάθηση της τεχνικής του pyrosequencing και για την παραχώρηση των χώρων και του υλικοτεχνικού εξοπλισμού του εργαστηρίου για την πραγματοποίηση των πειραμάτων. Τέλος, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την αμέριστη στήριξη που μου έχει προσφέρει όλα αυτά τα χρόνια.

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| <b>Πρόλογος</b> .....   | 5  |
| <b>Περιεχόμενα</b> .....  | 6  |
| <b>Εισαγωγή</b> .....   | 8  |
| Απόκριση στο στρες .....  | 8  |
| Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων .....   | 9  |
| Πηγές δια- και ενδοατομικής διαφοροποίησης στην απόκριση στο στρες.....   | 11 |
| Ενδομήτριο στρες, χαμηλό βάρος γέννησης και προωρότητα .....  | 15 |
| Γενετικοί, επιγενετικοί και μιτοχονδριακοί παράγοντες .....   | 17 |
| <i>FKBP5</i> .....  | 17 |
| <i>SLC6A4</i> .....   | 20 |
| <i>MBL2</i> .....   | 22 |
| <i>Μιτοχονδριακό DNA</i> .....  | 22 |
| <b>Σκοπός της Εργασίας</b> .....  | 23 |
| <b>Υλικά και Μέθοδοι</b> .....  | 24 |
| Πληθυσμός Έρευνας .....   | 24 |
| Κατηγοριοποίηση νεογνών .....   | 24 |
| Συλλογή των δειγμάτων .....   | 24 |
| Απομόνωση DNA.....  | 25 |
| Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR).....  | 25 |
| Πέψη με περιοριστικά ένζυμα.....  | 26 |
| Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....   | 27 |
| Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time Polymerase Chain Reaction – real time PCR) ..... | 27 |
| Ανάλυση μεθυλίωσης με pyrosequencing CpG assay.....   | 29 |
| Στατιστική Ανάλυση .....  | 30 |
| <b>Πειραματικά Αποτελέσματα</b> .....   | 31 |
| Δημογραφικά Στοιχεία .....  | 31 |
| Ανάλυση παραλλαγών και πολυμορφισμών του γονιδίου <i>SLC6A4</i> .....   | 33 |
| Ανάλυση παραλλαγών του γονιδίου <i>MBL2</i> .....   | 34 |
| Αποτελέσματα ανάλυσης παραλλαγών του γονιδίου <i>FKBP5</i> .....  | 36 |
| Αποτελέσματα ανάλυσης μεθυλίωσης.....   | 36 |
| Αποτελέσματα ανάλυσης μιτοχονδριακού DNA .....  | 40 |
| <b>Συζήτηση</b> .....   | 41 |
| <b>Περίληψη</b> .....   | 44 |

|                           |    |
|---------------------------|----|
| <b>Abstract</b> .....     | 45 |
| <b>Βιβλιογραφία</b> ..... | 46 |



## Εισαγωγή

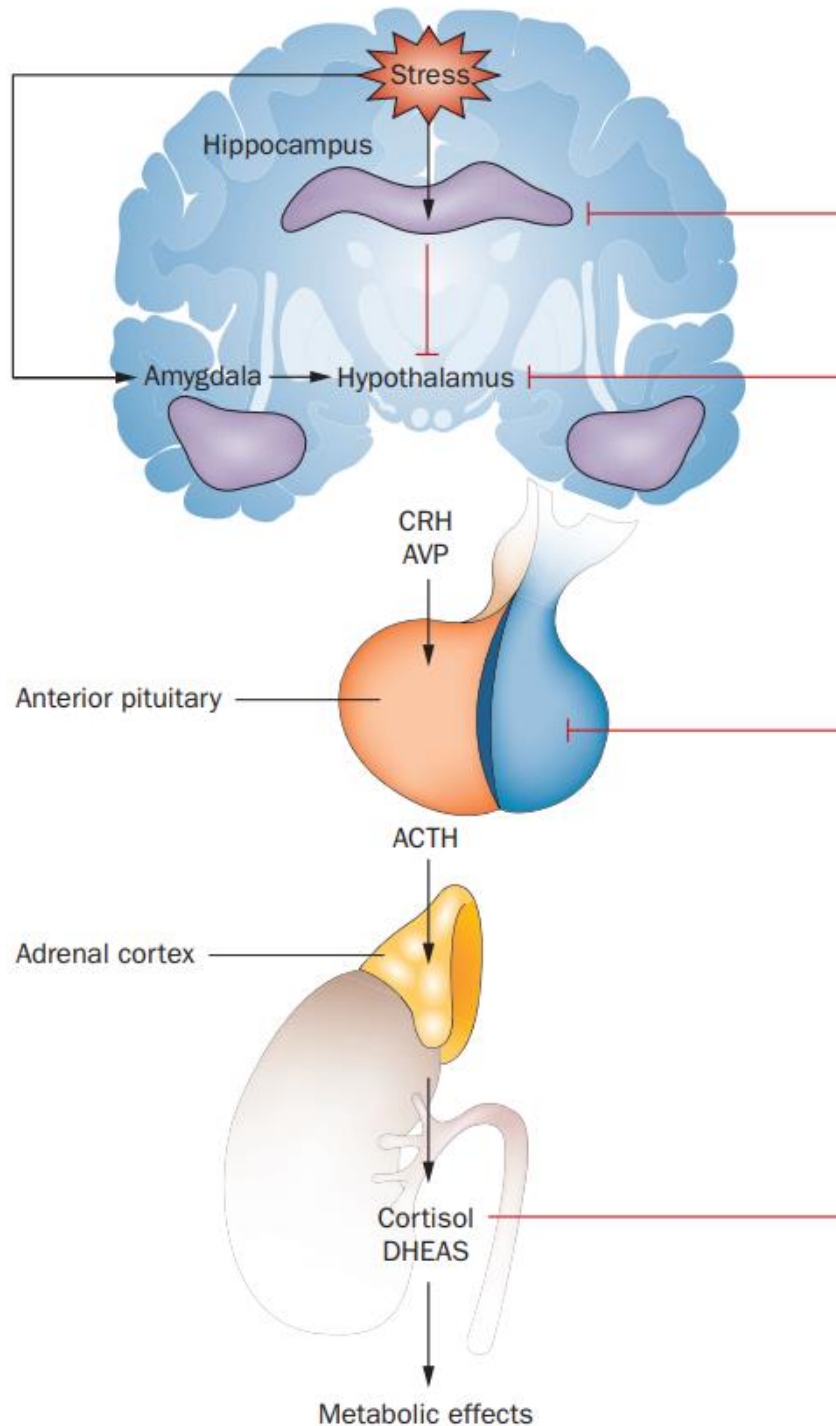
### Απόκριση στο στρες

Ο όρος στρες μπορεί να αναφέρεται σε δύο πράγματα: 1) στους εξωγενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες, τους οποίους το άτομο αντιλαμβάνεται ως απεχθείς και πιθανώς επιβλαβείς και 2) στην ψυχολογική ή/και φυσιολογική απόκριση του ατόμου απέναντι στην έκθεση σε αυτούς τους παράγοντες (Barrero-Castillero et al 2019, Sosnowski & Brosnan 2023). Το στρες διακρίνεται σε χρόνιο (στρεσογόνα κατάσταση που διαρκεί μεγάλα χρονικά διαστήματα) ή σε παροδικό (εμφάνιση απειλής που δημιουργεί μια στρεσογόνα αντίδραση), και η παροδική σε συνδυασμό με την χρόνια έκθεση στο στρες διαμορφώνει πως θα ανταποκριθεί ο οργανισμός σε κάθε μεμονωμένη περίπτωση (Sosnowski & Brosnan 2023). Η έκθεση σε στρεσογόνες καταστάσεις μπορεί να επηρεάσει την σωματική και ψυχική υγεία του ατόμου (Luo et al 2023) και έχει συνδεθεί με τον κίνδυνο εμφάνισης παθολογικών καταστάσεων (αθηροσκλήρωση, διαβήτη, βρογχικό άσθμα, ελκώδης κολίτιδα, ψυχιατρικές διαταραχές) που περιλαμβάνουν ακόμα και καρκίνο (Salleh 2008). Η απόκριση στο στρες διαφέρει σε κάθε άτομο, τόσο βιολογικά όσο και συμπεριφορικά, και περιλαμβάνει την ενεργοποίηση πολλών συστημάτων (νευρικό, ενδοκρινικό, ανοσοποιητικό, κλπ). Η ουδός (threshold) για την εμπλοκή του καθενός από αυτά τα συστήματα είναι συγκεκριμένη και ιδιαίτερα εξατομικευμένη, και καθορίζεται από γενετικούς, επιγενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Mifsud & Reul 2018). Αυτές οι διατομικές διαφορές παρατηρούνται τόσο στα διαφορετικά επίπεδα στρες που επιδεικνύει κάθε άτομο σύμφωνα με τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, τις στρεσογόνες εμπειρίες του και τον τρόπο ζωής του, όσο και στις άμεσες αντιδράσεις του όταν εκτεθεί σε έναν στρεσογόνο παράγοντα ή κατάσταση (Sosnowski & Brosnan 2023). Το σύστημα απόκρισης του στρες είναι εξελικτικά συντηρημένο, όμως αυτό που έχει αλλάξει είναι οι στρεσογόνοι παράγοντες στους οποίους εκτίθενται οι σύγχρονοι άνθρωποι, οι οποίοι αν και δεν απειλούν συνήθως άμεσα τη ζωή τους, είναι πολύ πιο συχνόι και παρατεταμένοι σε διάρκεια και επηρεάζουν κυρίως την ψυχική και κοινωνική ευημερία του ατόμου (de Kloet et al 1999, Monroe 2008, Nesse & Young 2000).

### **Άξονας Υποθαλάμου-Υπόφυσης-Επινεφριδίων**

Ο όρος αλλόσταση (allostasis) αναφέρεται στις προσαρμοστικές διαδικασίες (φυσιολογικές ή συμπεριφορικές) που πραγματοποιεί ο οργανισμός για να διατηρήσει την ομοιόσταση του απέναντι στην έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες (Barrero-Castillero et al 2019, McEwen 2005). Στην διαδικασία της αλλόστασης εμπλέκονται πολλαπλά νευροβιολογικά συστήματα (Chida & Hamer 2008). Τα κύρια συστατικά του αλλοστατικού συστήματος περιλαμβάνουν τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ), το καρδιαγγειακό σύστημα, το αυτόνομο νευρικό σύστημα και το ανοσοποιητικό σύστημα (McEwen 1998). Ο άξονας ΥΥΕ συνδέει τα συστήματα του εγκεφάλου που απαιτούνται για την αντίληψη μιας απειλής με τα σωματικά συστήματα που απαιτούνται για τη σωματική αντίδραση σε αυτή την απειλή (Selye 1950) και αποτελεί δομικό συστατικό της νευροενδοκρινικής απόκρισης στο στρες. Οι ορμόνες συνδέουν πολλά από τα στάδια αυτής της αντίδρασης, καθιστώντας τες βασικό φυσιολογικό δείκτη της δραστηριότητας του άξονα ΥΥΕ (Stratakis & Chrousos 1995). Η ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ οδηγεί στην απελευθέρωση κορτικοεκλυτίνης (CRF) από τους μικροκυτταρικούς (parvocellular) νευρώνες που βρίσκονται στον παρακουλιακό πυρήνα (PVN) του υποθαλάμου. Η CRF οδηγεί τη διάσπαση της προπιομελανοκορτινής (POMC) σε κορτικοτροπίνη (ACTH), β-ενδορφίνη και άλλα πεπτίδια και την επακόλουθη απελευθέρωσή τους στην πρόσθια υπόφυση μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Η ACTH δρα στον φλοιό των επινεφριδίων για να επάγει την έκκριση γλυκοκορτικοειδών (GCs) στην κυκλοφορία (Mifsud & Reul 2018). Το κύριο γλυκοκορτικοειδές στον άνθρωπο είναι η στεροειδής ορμόνη κορτιζόλη, η οποία επιδρά σε διάφορα μεταβολικά, ανοσολογικά, καρδιαγγειακά, συναισθηματικά, γνωστικά και συμπεριφορικά μονοπάτια, καθώς και στον ίδιο τον άξονα ΥΥΕ μέσω του υποδοχέα γλυκοκορτικοειδών (GR) και του υποδοχέα αλατικορτικοειδών (MR) (de Kloet et al 2005) (Εικόνα 1). Ο MR εμφανίζει 10 φορές μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης για τα GCs σε σχέση με τον GR (Oitzl et al 2010). Τα GCs δρουν σε μεγάλο αριθμό ιστών συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου για να επάγουν φυσιολογικές αποκρίσεις, επιδρώντας ακόμα και στον ίδιο τον άξονα ΥΥΕ και ρυθμίζοντας την δράση του μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης. Ο αριθμός των ενεργών ορμονών που επιδρούν στον εγκέφαλο ρυθμίζεται από το πόση ορμόνη εισέρχεται στον εγκέφαλο και πόση είναι ελεύθερη να ασκήσει την βιολογική της δράση (Mifsud & Reul 2018). Οι αποκρίσεις του άξονα ΥΥΕ στο στρες παρουσιάζουν μεγάλες ενδοατομικές (inter-individual) και διατομικές (intra-individual) διαφορές, αναδεικνύοντας τη μεγάλη προσαρμοστικότητα του συστήματος απόκρισης στο στρες. Για την κατανόηση των

μηχανισμών που συνδέουν τη ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ και τον κίνδυνο εμφάνισης ασθενειών, είναι ζωτικής σημασίας να προσδιοριστούν οι παράγοντες που συμβάλλουν σε αυτή τη διακύμανση (Zankert et al 2019).



**Εικόνα 1.** Σχηματική αναπαράσταση του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ).

Πηγή: Papadopoulos, A., Cleare, A. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 8, 22–32 (2012).

### Πηγές δια- και ενδοατομικής διαφοροποίησης στην απόκριση στο στρες

Ο προσδιορισμός παραγόντων που συμβάλλουν στην δια- και ενδο-ατομική διαφοροποίηση στην απόκριση στο στρες αποτελεί κύριο θέμα στην έρευνα του ψυχοβιολογικού στρες. Μέχρι σήμερα πολυάριθμοι παράγοντες φαίνεται να μπορούν να επηρεάσουν την δράση της κορτιζόλης. Ένας παράγοντας που συμβάλει σημαντικά στην διαφοροποίηση που παρατηρείται στην απόκριση του άξονα ΥΥΕ στο στρες είναι το φύλο. Η διαφοροποίηση μπορεί να οφείλεται σε φυσιολογικούς παράγοντες που υφίστανται μόνο στο ένα φύλο (π.χ. εμμηνορροϊκός κύκλος), στη λήψη ειδικών για κάθε φύλο φαρμακευτικών αγωγών (π.χ. λήψη αντισυλληπτικών) (Zankert et al 2019), καθώς και στον τρόπο που είναι σχεδιασμένα τα διάφορα τεστ που επιστρατεύονται σε μελέτες ώστε να προκαλούν διαφορετικούς τύπους στρες (π.χ. οι γυναίκες αντιδρούν βιολογικά περισσότερο στο διαπροσωπικό στρες, ενώ οι άνδρες αντιδρούν περισσότερο στους στρεσογόνους παράγοντες επίτευξης (achievements stressors) (Stroud et al 2017, Stroud et al 2002, Zankert et al 2019). Το γενετικό υπόβαθρο συμβάλλει επίσης σημαντικά στην δραστηριότητα του άξονα ΥΥΕ, όπως έχουν δείξει μελέτες σε διδύμους και γονιδιακής κλίμακας αναλύσεις συσχέτισης (genome-wide association studies, GWAS) (Zankert et al 2019). Παραλλαγές και πολυμορφισμοί σε γονίδια που ανήκουν στον άξονα ΥΥΕ (π.χ. *NR3C1*, *NR3C2*, *FKBP5*, *CRHR1*) (Ising et al 2008, Kudielka et al 2009, Kumsta et al 2013, Luijk et al 2010, Mahon et al 2013), ή σε άλλα νευροδιαβιβαστικά συστήματα, όπως το σεροτονινεργικό (*SLC6A4*) ή το ντοπαμινεργικό (*COMT*, *DRD4*) ή που κωδικοποιούν νευροπεπτίδια ή υποδοχείς των (*BDNF*, *ADRA2B*, *MAOA*, *NPSR*) (Allen et al 2017, Foley & Kirschbaum 2010, Miller et al 2013) μπορεί να επηρεάσουν την δράση της κορτιζόλης, αν και συνήθως η επίδραση αυτών των παραλλαγών είναι μικρή. Μεγάλο ενδιαφέρον στην έρευνα του ψυχοβιολογικού στρες έχει η κοινή ανάλυση γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, καθώς οι αλληλεπιδράσεις γονιδίων-περιβάλλοντος (gene x environment, GxE) ίσως μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών που συνδέουν το στρες με ασθένειες (Manolio et al 2009, Uher 2014). Για παράδειγμα, φαίνεται πως η ύπαρξη ιστορικού στεσογόνων εμπειριών σε συνδυασμό με την παρουσία συγκεκριμένων παραλλαγών και πολυμορφισμών στα γονίδια *SLC6A4* ή *FKBP5* (Alexander et al 2009, Buchmann et al 2014, Luijk et al 2010, Zannas & Binder 2014) επηρεάζει την δραστηριότητα της κορτιζόλης στην απόκριση στο στρες. Επιγενετικοί μηχανισμοί, όπως η μεθυλίωση και οι τροποποιήσεις των ιστονών, φαίνεται πως έχουν σημαντικό ρόλο στην νευροβιολογική απόκριση του οργανισμού απέναντι στο στρες. Αυτού του είδους οι τροποποιήσεις επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως π.χ. ψυχοκοινωνικοί παράγοντες σαν το προγεννητικό μητρικό στρες και οι αντιξοότητες κατά την

πρώιμη ζωή (Allen et al 2017, Isles 2015, Serpeloni et al 2016, Turecki 2016). Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του GR συνδέεται με τον χρόνο που απαιτείται για την επαναφορά των επιπέδων κορτιζόλης μετά την έκθεση σε στρες (van der Knaap et al 2015) και επίσης έχει αναφερθεί πως ασκεί ρυθμιστικό ρόλο στη σχέση μεταξύ παιδικού τραύματος και της δράσης της κορτιζόλης απέναντι στο στρες (Alexander et al 2018). Η έρευνα σε γονιδιακής κλίμακας (genome wide) επίπεδο μπορεί επίσης να βοηθήσει στην ανακάλυψη μονοπατιών που συνδέουν την μεθυλίωση με την ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ (Houterpen et al 2016). Οι έρευνες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει πως το στρες μπορεί να επηρεάσει την μεθυλίωση σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου αλλά ακόμα δεν έχει γίνει σαφές αν αυτές οι αλλαγές είναι προστατευτικές ή επιβαρυντικές ως προς την ρύθμιση της απόκρισης σε στρες (Hunter et al 2015). Ο τρόπος ζωής και συμπεριφοράς είναι ακόμα ένας παράγοντας που επηρεάζει την δράση του άξονα ΥΥΕ στην απόκριση στο στρες. Η χρόνια ή/και σε μεγάλες ποσότητες κατανάλωση αλκοόλ, ο εθισμός σε αυτό και η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού εθισμού (Foley & Kirschbaum 2010, Kudielka et al 2009, Van Hedger et al 2017) καθώς και η χρόνια ή βραχυπρόθεσμη λήψη φαρμακευτικής αγωγής, εμβολίων ή συμπληρωμάτων διατροφής (Houterpen et al 2015, Strahler et al 2017, Zorn et al 2017) μπορεί να επηρεάσουν την απόκριση του άξονα ΥΥΕ στο ψυχοκοινωνικό στρες. Το ελαφρύ ή βαρύ κάπνισμα και η κατανάλωση καφεΐνης έχουν διεγερτική δράση στην ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ απέναντι στην έκθεση σε στρες (Kudielka et al 2009, Van Hedger et al 2017). Η χρόνια κατανάλωση καφεΐνης και η χρήση νικοτίνης μέσω της απελευθέρωσης CRH θα μπορούσε να οδηγήσει σε βάθος χρόνου σε αυξημένα επίπεδα ACTH και κορτιζόλης και, κατά συνέπεια, σε εξασθενημένη ανταπόκριση του άξονα ΥΥΕ στο οξύ ψυχοκοινωνικό στρες (Herbison et al 2016, Kudielka et al 2009, Rohleder & Kirschbaum 2006, Van Hedger et al 2017). Η πρόσληψη τροφής και ενέργειας επίσης επηρεάζει και επηρεάζεται από τα επίπεδα κορτιζόλης, με τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης να συνδέονται με χαμηλά επίπεδα κορτιζόλης στην απόκριση στο στρες (Kudielka et al 2009). Το σωματικό βάρος και η φυσική κατάσταση μπορούν να επηρεάσουν την απόκριση του άξονα ΥΥΕ στο στρες, με την παχυσαρκία να συνδέεται με αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης ως απόκριση στο ψυχοκοινωνικό στρες (Incollingo Rodriguez et al 2015) ενώ η σωματική άσκηση έχει προστατευτική δράση και συνδέεται με μειωμένα επίπεδα κορτιζόλης (Klaperski et al 2013, Rimmele et al 2009, Strahler et al 2016). Είναι λογικό να υπάρχει η άποψη πως το κοινωνικό περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει την απόκριση του οργανισμού στο στρες και πράγματι διάφορα τεστ, όπως το Trier Social Stress Test (TSST), λαμβάνουν υπόψιν την έκθεση σε στρεσογόνες δοκιμασίες (περιβαλλοντικοί παράγοντες) ως προς την ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ. Το TSST είναι σχεδιασμένο ώστε να προκαλεί στους

εξεταζόμενους ψυχολογικό στρες βάζοντας τους να εκτελέσουν κάποιες εργασίες (π.χ. αριθμητικές πράξεις) μπροστά σε θεατές και στην συνέχεια αξιολογείται ο αντίκτυπος αυτής της πράξης στην φυσιολογική απόκριση στο στρες (Kirschbaum et al 2008). Συγκεκριμένα έρευνες έχουν δείξει πως στους άνδρες η κοινωνική υποστήριξη οδήγησε σε εξασθενημένη ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ ως απόκριση στο TSST (Ditzen et al 2008, Kirschbaum et al 1995, Kudielka et al 2009), με το νευροπεπτίδιο ωκυτοκίνη να εξετάζεται ως ένας βιολογικός αιτιώδης σύνδεσμος (Hostinar et al 2014). Άλλος κοινωνικός παράγοντας που ίσως έχει σημασία είναι η θέση στην κοινωνική ιεραρχία, όπως έδειξε μια παλαιότερη μελέτη σε νεοσύλλεκτους στρατιώτες (Hellhammer et al 1997). Ακόμα, ψυχολογικές παρεμβάσεις συμπεριφορικής διαχείρισης του στρες, ασκήσεις του νου και του σώματος, ορισμένες μορφές διαλογισμού και η χαλαρωτική μουσική έχει αποδειχθεί ότι μπορούν να μειώσουν τις νευροενδοκρινική απόκριση του οργανισμού σε επακόλουθη οξεία έκθεση σε ψυχολογικό στρες (Kudielka et al 2009). Η προσωπικότητα επηρεάζει την τάση του ατόμου τόσο προς την διαμόρφωση των συνθηκών που οδηγούν στην έκθεση του σε στρες, όσο και ως προς την φυσιολογική και ψυχολογική απόκριση του απέναντι στον στρεσογόνο παράγοντα (Contrada & Baum 2010, Epel et al 2018, Harkness & Washburn 2016, Kudielka et al 2009, Luo et al 2023, Smith 2006). Μία πρόσφατη μετα-ανάλυση έδειξε πως συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του μοντέλου των 5 παραγόντων (νευρωτισμός, συνεργατικότητα, εξωστρέφεια, ευσυνειδησία, διαθεσιμότητα σε εμπειρίες) συνδέονται με διαφορετικές εννοιολογικές προσεγγίσεις του στρες, και μπορούν να συμβάλλουν στην κατανόηση των ατομικών διαφορών στην απόκριση στο στρες. Συγκεκριμένα, ο νευρωτισμός παρουσίασε θετική συσχέτιση με το στρες ενώ η εξωστρέφεια, η συνεργατικότητα, η ευσυνειδησία και, σε μικρότερο βαθμό, η διαθεσιμότητα σε εμπειρίες παρουσίασαν αρνητική (Luo et al 2023). Ο νευρωτισμός και η χαμηλή εξωστρέφεια φαίνεται πως επιδρούν και στην δράση του άξονα ΥΥΕ μετά την έκθεση σε στρες (Oswald et al 2006). Η σχέση μεταξύ στρες και προσωπικότητας μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες, όπως π.χ. από το πως καθορίζεται το στρες σε μια μελέτη, το σχεδιασμό της μελέτης, την σύσταση του δείγματος καθώς και τον τρόπο αξιολόγησης στην έκθεση σε στρες (Luo et al 2023). Είναι λογική η υπόθεση πως το χρόνια στρες, η εξάντληση και η επαγγελματική εξουθένωση μπορεί να καταλήξει μακροπρόθεσμα, σε μόνιμες αλλαγές στη ρύθμιση του άξονα ΥΥΕ (Chida & Hamer 2008, Eddy et al 2018, Heim et al 2000, Kudielka et al 2006, Miller et al 2007). Ένας παράγοντας που μπορεί να συμβάλλει στην μεγάλη διαφοροποίηση που παρατηρείται στη δράση του άξονα ΥΥΕ σε άτομα με χρόνια στρες είναι η εννοιολογική προσέγγιση του στρες και ο τρόπος αξιολόγησης του, που μπορεί να διαφέρει από μελέτη σε μελέτη (Zankert et al 2019). Άτομα που ζουν υπό συνθήκες χρόνιου στρες

παρουσιάζουν υποκορτιζολισμό, που μπορεί να οφείλεται σε μειωμένη σύνθεση CRH, ACTH και κορτιζόλης, υπερέκκριση CRH, προσαρμοστική μείωση των υποδοχέων CRH της υπόφυσης ή αλλαγές στην ευαισθησία των, αυξημένη ευαισθησία στην ανατροφοδότηση του άξονα ΥΥΕ ή μορφολογικές αλλαγές (Heim et al 2000). Μελέτες πάνω στο φαινόμενο της επαγγελματικής εξουθένωσης με βάση συγκεκριμένα μοντέλα δείχνουν μειωμένη αντίδραση του άξονα ΥΥΕ στο οξύ στρες (Bellingrath & Kudielka 2016, Eddy et al 2018). Αντίστοιχα, πρόσφατες μελέτες που εξετάζουν την εξάντληση δείχνουν επίσης χαμηλά επίπεδα κορτιζόλης ως απόκριση στο ψυχοκοινωνικό στρες (Bellingrath & Kudielka 2016, de Vente et al 2015, Eddy et al 2018, Jonsson et al 2015, Lennartsson et al 2015). Το στρες συμμετέχει στην εμφάνιση και εξέλιξη διαφόρων ασθενειών και πολλές σωματικές και ψυχιατρικές παθήσεις συνοδεύονται από αλλαγές στη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ εξαιτίας της έκθεσης σε στρες (Chrousos 2009). Τα ευρήματα σχετικά με συγκεκριμένες ασθένειες δεν είναι συνήθως ξεκάθαρα (π.χ. διαφορετικά αποτελέσματα στη δράση του άξονα ΥΥΕ ανάλογα με τον τύπο της κατάθλιψης), αν και κυρίως υποδηλώνουν μειωμένη δραστηριότητα του άξονα ΥΥΕ σε καταστάσεις όπως π.χ. η σχιζοφρένεια, η διαταραχή μετατραυματικού στρες (post-traumatic stress disorder, PTSD), το σύνδρομο χρόνιας κόπωσης, η ινομυαλγία και η ατοπική δερματίτιδα και, ενδεχομένως, οι αγχώδεις διαταραχές (Zankert et al 2019).

Η εγκυμοσύνη συνδέεται με αυξημένα επίπεδα CRH, ACTH και κορτιζόλης των οποίων η κυκλοφορία κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης οδηγεί σε αρνητική ανατροφοδότηση και ίσως βοηθούν στο να αμβλυυνθεί η απόκριση του άξονα ΥΥΕ απέναντι στις προκλήσεις (Zankert et al 2019). Ο θηλασμός φαίνεται να ασκεί βραχυπρόθεσμα κατασταλτική δράση στη δράση της κορτιζόλης απέναντι στο ψυχοκοινωνικό στρες (Heinrichs et al 2001). Μακροχρόνιες αλλαγές στην λειτουργία του άξονα ΥΥΕ απέναντι στο οξύ στρες στην ενήλικη ζωή μπορούν επίσης να αποδοθούν σε παράγοντες που χρονολογούνται από την περίοδο πριν τη σύλληψη και κατά την διάρκεια της ενδομήτριας ζωής. Δείκτες προγεννητικής ανάπτυξης (όπως το βάρος γέννησης και η διάρκεια της κύησης), αλλά και οι προγεννητικές και πρώιμες μεταγεννητικές περιβαλλοντικές αντιξοότητες (όπως η έκθεση προγεννητικά σε ουσίες ή σε ψυχοκοινωνικές αντιξοότητες κατά την πρώιμη παιδική ηλικία), φαίνεται να συνδέονται με πιθανές μακροχρόνιες αλλαγές στις αντιδράσεις του άξονα ΥΥΕ στο στρες (Bunea et al 2017, Hunter et al 2011, Kajantie & Raikonen 2010). Τέλος, οι ατομικές διαφορές που παρατηρούνται στην απόκριση σε στρες μπορεί να οφείλονται και στις μεθοδολογικές πτυχές κάθε μελέτης. Αυτές μπορεί να αφορούν την ώρα που γίνεται η εξέταση, καθώς επηρεάζεται η έκκριση κορτιζόλης (Kudielka et al 2004) ή το αν η αιμοληψία έγινε πριν τη λήψη σιέλου (Weckesser et al 2014). Ακόμα, τα επίπεδα κορτιζόλης μπορεί να

επηρεάσει η εξοικείωση που οφείλεται σε παρατεταμένη έκθεση σε έναν στρεσογόνο παράγοντα (Wust et al 2005), το άγχος που μπορεί να συνοδεύει την αναμονή της έκθεσης σε στρεσογόνες καταστάσεις (Engert et al 2013), η διαφορά μεταξύ της υποκειμενικής και αντικειμενικής αντίληψης του στρες (Campbell & Ehler 2012), καθώς και ο διαφορετικός τρόπος που χρησιμοποιούν τα τεστ, όπως π.χ. το TSST, τα διάφορα εργαστήρια για να αξιολογήσουν το στρες (Goodman et al 2017).

### **Ενδομήτριο στρες, χαμηλό βάρος γέννησης και προωρότητα**

Σύμφωνα με την υπόθεση των αναπτυξιακών απαρχών της υγείας και της νόσου (Developmental Origins of Health and Disease, DOHaD), έκθεση σε στρεσογόνο περιβάλλον κατά τα πρώτα στάδια της ζωής μπορεί να επηρεάσει μελλοντικά την υγεία του ανθρώπου και την εμφάνιση ασθενειών (Barker 1990, Barker 2007). Το ενδομήτριο περιβάλλον έχει σημαντική επιρροή στην προγεννητική ανάπτυξη και η έκθεση σε δυσμενείς περιβαλλοντικούς παράγοντες κατά την εμβρυϊκή περίοδο (κακή διατροφή της μητέρας, μητρική παχυσαρκία, έκθεση σε στρεσογόνους παράγοντες όπως φυσικές καταστροφές, ρύπους κ.α.), μπορεί να προκαλέσει αλλαγές σε πολλαπλά βιολογικά μονοπάτια, και να έχει αρνητικό αντίκτυπο στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, την παιδική συμπεριφορά και συναισθηματική ανάπτυξη, καθώς και να αυξήσει τον κίνδυνο για μεταβολικά, καρδιαγγειακά, νευρολογικά και ψυχικά προβλήματα υγείας το οποία θα υφίστανται πολύ μετά το πέρας της εμβρυϊκής περιόδου (Barrero-Castillero et al 2019, Calkins & Devaskar 2011, Fleming et al 2021). Η έκθεση σε προγεννητικό μητρικό στρες αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα υγείας το οποίο επηρεάζει πολλά παιδιά (Lautarescu et al 2020) και μελέτες πάνω σε ανθρώπους και ζωικά μοντέλα δείχνουν πως η εμβρυϊκή έκθεση σε στρες επιδρά στην απόκριση του ατόμου στο στρες στην μετέπειτα ζωή του (Barrero-Castillero et al 2019). Στους πιθανούς μηχανισμούς με τους οποίους το μητρικό στρες μεταφέρεται στο έμβρυο και στους πιθανούς διαγενεακούς στρεσογόνους παράγοντες περιλαμβάνονται η διαπλακουντιακή μεταφορά βιοδραστικών μορίων, οι αυτόνομες εμβρυϊκές αποκρίσεις στις αλλαγές του ενδομήτριου περιβάλλοντος και οι επιγενετικοί μηχανισμοί (Provencal & Binder 2015). Όσον αφορά τα βιοδραστικά μόρια, η έκθεση του εμβρύου σε αυξημένα επίπεδα κορτιζόλης που μεταφέρονται μέσω του πλακούντα θα μπορούσε να οδηγήσει σε διαταραχή της ανάπτυξης και της επακόλουθης λειτουργίας του άξονα ΥΥΕ, με τον αντίκτυπο αυτών των πρώιμων εκθέσεων να εκτείνεται σε πολλές γενιές (Barrero-Castillero et al 2019, McGowan & Matthews 2018). Μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι η επίδραση του μητρικού άγχους, της κατάθλιψης καθώς και των στρεσογόνων εμπειριών κατά την εγκυμοσύνη, στη λειτουργία του άξονα ΥΥΕ και την απόκριση των παιδιών στο στρες πιθανώς εξαρτάται από:



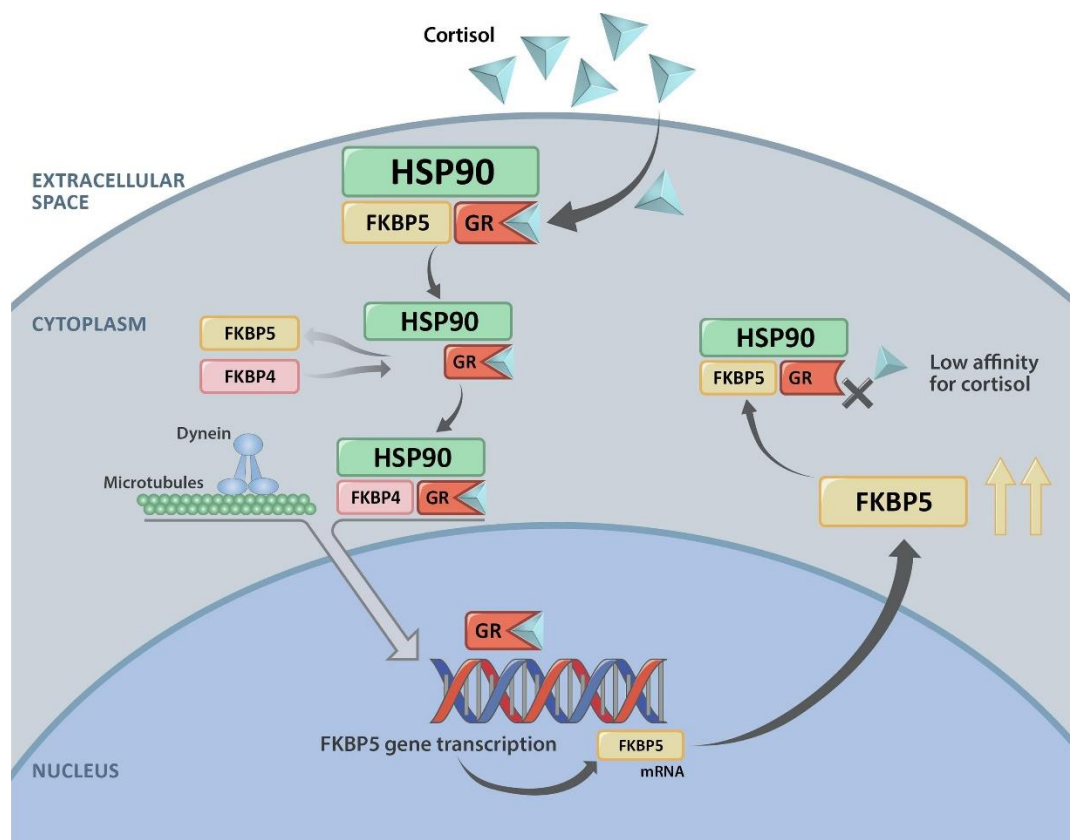
το στάδιο της εγκυμοσύνης κατά το οποίο έγινε η έκθεση στο στρες, την ηλικία και το φύλο του βρέφους/παιδιού. Ακόμα ρόλο φαίνεται να παίζει για την μελλοντική υγεία του παιδιού και το είδος του στρεσογόνου παράγοντα (π.χ. μητρική κατάθλιψη, άγχος, φυσικές καταστροφές) που αντιμετώπισε η μητέρα και οδήγησε σε ενεργοποίηση του άξονα ΥΥΕ (McGowan & Matthews 2018).

Ο μεγάλος αριθμός στρεσογόνων εμπειριών, το αυξημένο άγχος και η κατάθλιψη κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης έχουν συσχετιστεί με χαμηλό βάρος γέννησης (ΧΒΓ) του νεογνού, αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, προεκλαμψίας και άλλων προβλημάτων υγείας μελλοντικά (Lautarescu et al 2020, Miller et al 2017, Papadopoulou et al 2019). Το ΧΒΓ, εκτός από παράγοντας κινδύνου για νεογνική νοσηρότητα και θνησιμότητα, έχει προταθεί και ως δείκτης αντιξοοτήτων στην πρώιμη ζωή (McCormick 1985, Stein et al 1987, Watkins et al 2016, Waxman et al 2014), ενώ το βάρος γέννησης αναγνωρίζεται ως προγνωστικός παράγοντας κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών σε ενήλικες σε πολλά μοντέλα DOHaD (Wadhwa et al 2009). Δυσμενείς εκβάσεις στην κύηση όπως ΧΒΓ, χαμηλό βάρος για την ηλικία κύησης (small for gestational age, SGA) και ο πρόωρος τοκετός μπορούν ως ένα βαθμό να οφείλονται και στην δράση του άξονα ΥΥΕ, με την προωρότητα και το SGA να συνδέονται με αλλαγές στην λειτουργία του άξονα ΥΥΕ που οδηγούν σε αυξημένη ευαισθησία στις αντιξοότητες ενώ το χαμηλό βάρος γέννησης μπορεί να σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα κυκλοφορούντων GCs (Su et al. 2021).

## Γενετικοί, επιγενετικοί και μιτοχονδριακοί παράγοντες

### *FKBP5*

Το γονίδιο *FKBP5* κωδικοποιεί την FK506-binding protein 51 (FKBP1), μια ανοσοφιλίνη, η οποία αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή του ορμονικού συστήματος απόκρισης στο στρες, και συγκεκριμένα του συμπλόκου των GRs (Klengel et al 2013). Η FKBP51 εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλοκο με τους GRs, την heat shock protein 90 (hsp90), και άλλες πρωτεΐνες (Wochnik et al 2005) και όταν τα επίπεδα GC είναι χαμηλά, η FKBP1 μαζί με άλλες πρωτεΐνες-συνοδούς (chaperones) και πρωτεΐνες θερμικού σοκ σταθεροποιεί τον GR στη μη ενεργή μορφή του στο κυτταρόπλασμα. Μετά την αύξηση των επιπέδων GC, οι GRs αποδεσμεύουν την FKBP51 και άλλες πρωτεΐνες, δεσμεύουν GCs, σχηματίζουν ένα διμερές με έναν άλλο GR στον οποίο έχουν δεσμευτεί GCs και μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου προσδένονται σε περιοχές γνωστές ως στοιχεία απόκρισης σε γλυκοκορτικοειδή (Glucocorticoid Response Elements, GREs) και ενεργοποιούν ή καταστέλλουν την μεταγραφή γονιδίων (Nixon et al 2013, Presman et al 2016). Τα διμερή των GRs όταν μετατοπιστούν στον πυρήνα προσδέεται σε GREs στην περιοχή του υποκινητή του *FKBP5*. Αυτό δημιουργεί έναν βρόχο αρνητικής ανατροφοδότησης ιδιαίτερα σημαντικό για την λειτουργία του ορμονικού συστήματος απόκρισης στο στρες, στον οποίο η αύξηση των GCs οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του *FKBP5*, που στη συνέχεια προσδέεται στους GRs και τους διατηρεί στην ανενεργή κατάσταση τους (Εικόνα 2) (Klengel et al 2013, Rein 2016, Scammell et al 2001, Wang et al 2018). Τα παραπάνω αναδεικνύουν πως τα επίπεδα και η δράση της FKBP51 αποτελούν σημαντικό ρυθμιστή της δράσης των GRs, οι οποίοι αποτελούν σημαντικό στοιχείο της λειτουργίας του άξονα ΥΥΕ. Το συγκεκριμένο γονίδιο συνδέεται με ψυχιατρικές, νευροενδοκρινικές και μεταβολικές διαταραχές (Duis et al 2018).



**Εικόνα 2.** Σχηματική αναπαράσταση του βρόχου αρνητικής ανατροφοδότησης που δημιουργείται από την δέσμευση της κορτιζόλης στον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών (GR) και την επακόλουθη έκφραση της FKBP51.

Πηγή: Bancos I, Hatiroglu BA, Yuen KCJ, Chandramohan L, Chaudhari S, Moraitis AG. Evaluation of FKBP5 as a cortisol activity biomarker in patients with ACTH-dependent Cushing syndrome. *J Clin Transl Endocrinol.* 2021 Jun 6;24:100256. doi: 10.1016/j.jcte.2021.100256.

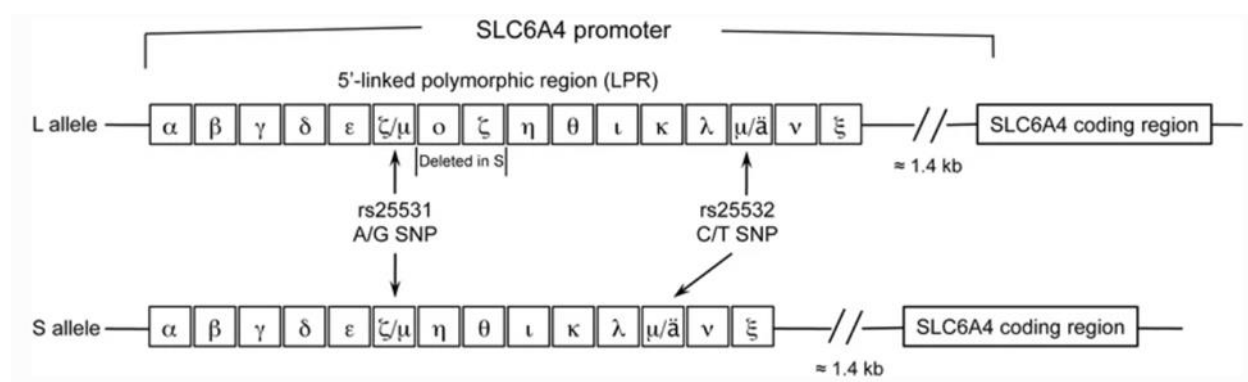
Στο δεύτερο ιντρόνιο του γονιδίου *FKBP5* κοντά σε ένα GRE εντοπίζεται η παραλλαγή ενός νουκλεοτιδίου (Single Nucleotide Variant, SNV) rs1360780 (C>T). Το αλληλόμορφο T της συγκεκριμένης SNV οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου και έχει χαρακτηριστεί ως αλληλόμορφο κινδύνου καθώς συνδέεται με ασθένειες που οφείλονται σε απορρύθμιση του άξονα ΥΥΕ (Paquette et al 2014). Η απορρύθμιση φαίνεται στον χρόνο επαναφοράς των επιπέδων κορτιζόλης μετά την έκθεση σε στρες (Buchmann et al 2014, Duis et al 2018) και στην παρεμπόδιση ανατροφοδότησης μέσω των GRs (Binder et al 2004). Η παραλλαγή rs1360780 έχει συνδεθεί με την εμφάνιση ψυχιατρικών διαταραχών και ειδικά με αυτές που εμφανίζουν ισχυρή συσχέτιση με την έκθεση σε στρες, όπως το PTSD (Binder et al 2008) και η κλινική κατάθλιψη (major depressive disorder, MDD) (Binder et al 2004). Η αυξημένη έκφραση που παρατηρείται εξαιτίας του αλληλόμορφου T φαίνεται πως εξαρτάται και από την βαθμό μεθυλίωσης πολλών ιντρονικών CpGs (Binder et al 2008, Hohne et al 2014), καθώς έχει φανεί πως φορείς του αλληλομόρφου T που εκτέθηκαν σε τραυματικές εμπειρίες σε

παιδική ηλικία εμφάνιζαν χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης σε ιντρόνια του *FKBP5* (Klengel et al 2013), ενώ φορείς του αλληλομόρφου T που εκτέθηκαν ενδομήτρια σε διαταραχές της διάθεσης από τις οποίες έπασχε η μητέρα παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε CpGs του ιντρονίου 5 (Duis et al 2018). Μια πιθανή εξήγηση είναι ότι η παραλλαγή rs1360780 δημιουργεί στην αλληλουχία θέσεις πρόσδεσης για έναν άγνωστο μεταγραφικό παράγοντα, ο οποίος μπορεί να επηρεάσει τη γονιδιωματική αρχιτεκτονική της περιοχής. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη συγγένεια δέσμευσης των GR στα GREs και στην πιθανή αλληλεπίδραση των GRs με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στην περιοχή του υποκινητή (Duis et al 2018). Η παρουσία του T αλληλομόρφου είτε σε ομοζυγωτία, είτε σε ετεροζυγωτία έχει συνδεθεί με αλλαγές στην φυσιολογική ρύθμιση του στρες σε νεογνά (Luijk et al 2010, Raquette et al 2014). Σε ανθρώπινες λεμφοβλάστες η πρόσβαση των GRs στα GRE του *FKBP5* ελέγχεται από την κατάσταση μεθυλίωσης του DNA (Klengel et al 2013), και η μεθυλίωση του *FKBP5* συνδέεται με λειτουργικές αλλαγές στον εγκέφαλο και τον κίνδυνο εμφάνισης ψυχικών ασθενειών (Raquette et al 2014). Παιδιά που έχουν εκτεθεί σε βίαιο περιβάλλον παρουσιάζουν χαμηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης στην περιοχή του υποκινητή του *FKBP5* (Everson et al 2023) και η μεθυλίωση του *FKBP5* σε νεογνά έχει συσχετιστεί με την έκθεση των μητέρων τους σε δυσμενείς συνθήκες κατά την παιδική τους ηλικία (Grasso et al 2020).

### *SLC6A4*

Η σεροτονίνη (5-υδροξυτρυπταμίνη, 5-HT) είναι ένας νευροδιαβιβαστής που παράγεται και απελευθερώνεται από τους σεροτονινεργικούς νευρώνες στον πυρήνα της ραφής (raphe nucleus) του κεντρικού νευρικού συστήματος, και τα επίπεδα του οποίου επηρεάζουν την απόκριση του οργανισμού στο στρες (Ehli et al 2012). Η σεροτονινεργική νευροδιαβίβαση επηρεάζει ένα μεγάλο εύρος συμπεριφορών, από την διατροφική συμπεριφορά και την αναπαραγωγική δραστηριότητα, μέχρι την επεξεργασία οπτικών ερεθισμάτων και την κινητική δραστηριότητα, την αντίληψη και το συναίσθημα, την διάθεση, τον ύπνο, τον θυμό (Canli & Lesch 2007, Steiger et al 2007). Ο «κύριος μεταφορέας» του σεροτονινεργικού συστήματος είναι ο μεταφορέας σεροτονίνης (5-HTT), που κωδικοποιείται από το γονίδιο *SLC6A4*, και αφαιρεί την σεροτονίνη που απελευθερώνεται από τον προσυναπτικό νευρώνα στην συναπτική σχισμή και την μεταφέρει πίσω στην νευρική απόληξη ώστε να ανακυκλωθεί σε νέα συναπτικά κυστίδια (Iurescia et al 2016, Serretti et al 2006). Επειδή ο 5-HT επηρεάζει δυναμικά την δράση της σεροτονίνης συνδέεται με πλήθος νευροβιολογικών διαταραχών, κυρίως ψυχιατρικών, και αποτελεί σημαντικό θεραπευτικό στόχο των επιλεκτικών αναστολέων επαναπρόσληψης σεροτονίνης σε πολλές ψυχιατρικές διαταραχές (Ehli et al 2012, Iurescia et al 2016). Η μεταγραφική δραστηριότητα του *SLC6A4* ρυθμίζεται από πολλές παραλλαγές, συμπεριλαμβανομένου ενός πολυμορφισμού, της συνδεδεμένης με το μεταφορέας σεροτονίνης πολυμορφικής περιοχής (*5-HTTLPR*) (Canli & Lesch 2007). Η 5-HTTLPR βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *SLC6A4* και είναι μία πολυμορφική περιοχή ποικίλου αριθμού διαδοχικών επαναλήψεων (VNTR, Variable Number Tandem Repeats), η οποία αποτελείται από έναν αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων μεγέθους 20 με 24 ζευγών βάσεων. Τα πιο κοινά αλληλόμορφα κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: το μικρό (S, short allele) με 14 επαναλαμβανόμενες μονάδες και το μεγάλο (L, long allele) με 16 επαναλαμβανόμενες μονάδες (Ikegame et al 2021, Iurescia et al 2016) (Εικόνα 3). Το μικρό αλληλόμορφο οδηγεί σε μειωμένη μεταγραφή του γονιδίου, οδηγώντας σε μειωμένη έκφραση και διαθεσιμότητα του 5-HTT και επαναπρόσληψη σεροτονίνης (Iurescia et al 2016, Lesch et al 1996). Η παρουσία του μικρού αλληλομόρφου με ταυτόχρονη έκθεση σε στρεσογόνες εμπειρίες έχει συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο για εμφάνιση κατάθλιψης στην ενήλικη ζωή. Τα νεογνά με πολύ χαμηλό βάρος γέννησης αποτελούν μία ομάδα με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης κατάθλιψης καθώς εκτίθενται σε ένα ενδομήτριο περιβάλλον επιβαρυντικό για την σωστή ανάπτυξη τους και μετά την γέννα νοσηλεύονται σε μία μονάδα εντατικής νοσηλείας νεογνών (MENN) (χωρίς την συνεχή επαφή με την μητέρα τους) που είναι επίσης ένα

ιδιαίτερα στρεσογόνο περιβάλλον (Lahat et al 2017, Saul et al 2019). Εντός της 5-HTTLPR εντοπίζεται επίσης η παραλλαγή rs25531 (A>G), η παρουσία της οποίας επίσης επηρεάζει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου, με το αλληλόμορφο G να οδηγεί σε χαμηλότερη μεταγραφική δραστηριότητα (Ehli et al 2012, Hu et al 2006). Η έκθεση σε στρες κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στην μεθυλίωση του γονιδίου *SLC6A4* (Lesch 2011). Το μοτίβο μεθυλίωσης του *SLC6A4* έχει συνδεθεί με την έκθεση σε βίαια περιβάλλοντα σε μελέτη με υιοθετημένα παιδιά (Philibert et al 2007) και με την προγεννητική έκθεση στη μητρική κατάθλιψη (Devlin et al 2010). Μελέτες έχουν δείξει πως η νοσηλεία σε ΜΕΝΝ πρόωρων νεογνών οδηγεί σε αύξηση στα επίπεδα μεθυλίωσης CpGs στον υποκινητή του γονιδίου, τόσο στα πρώιμα όσο και σε μετέπειτα στάδια της ζωής τους (Chau et al 2014, Montirosso et al 2016, Provenzi et al 2015).



**Εικόνα 3.** Σχηματική αναπαράσταση των μικρών και μεγάλων αλληλομόρφων του *SLC6A4*. Η γενετική αρχιτεκτονική του 5-HTTLPR, που βρίσκεται ανοδικά της ρυθμιστικής περιοχής, αποτυπώνεται με λεπτομέρεια. Οι ξεχωριστές επαναλαμβανόμενες υπομονάδες του 5-HTTLPR αναγράφονται με ελληνικά γράμματα.

Πηγή: Iurescia, S., Seripa, D. & Rinaldi, M. Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and In Vitro Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants. *Mol Neurobiol* 53, 5510–5526 (2016).

### *MBL2*

Το γονίδιο *MBL2* κωδικοποιεί την πρωτεΐνη λεκτίνη (MBL) η οποία αποτελεί σημαντικό συστατικό της φυσικής ανοσίας των νεογνών. Η πρωτεΐνη MBL είναι σημαντική για την άμυνα των νεογνών απέναντι σε λοιμώξεις καθώς η επίκτητη ανοσία δεν έχει αναπτυχθεί επαρκώς ακόμα (Turner 2003). Η MBL δεσμεύεται σε επιφανειακούς υδατάνθρακες που εμφανίζονται σε πολλά είδη μικροοργανισμών και στη συνέχεια ενεργοποιεί το σύστημα του συμπληρώματος (Dzwonek et al 2008). Τα χαμηλά επίπεδα MBL έχουν συνδεθεί με μεγαλύτερο κίνδυνο περιγεννητικών λοιμώξεων, σήψης και πρόωρου τοκετού (Auriti et al 2010, Dzwonek et al 2008, Ozkan et al 2012, Speletas et al 2015). Τα επίπεδα της πρωτεΐνης MBL επηρεάζονται από την ύπαρξη διάφορων παραλλαγών στην αλληλουχία του γονιδίου *MBL2* (Koroglu et al 2010). Δύο από αυτές τις παραλλαγές εντοπίζονται στο εξώνιο 1 του γονιδίου και έχουν συνδεθεί με πολύ χαμηλά επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης. Αυτές οι SNVs αναφέρονται στην βιβλιογραφία ως αλληλόμορφο B (rs1800450) και ως αλληλόμορφο C (rs1800451), ενώ το αλληλόμορφο αγρίου τύπου αναφέρεται ως αλληλόμορφο A και στις δύο περιπτώσεις (Garred et al 2003). Σε πρόωρα νεογνά οι συγκεκριμένες παραλλαγές έχουν συνδεθεί με την εμφάνιση σήψης, αναπνευστικών προβλημάτων και πρόωρου τοκετού (Bodamer et al 2006, Dogan et al 2020, Frakking et al 2006, Koroglu et al 2010, Speletas et al 2015).

### *Μιτοχονδριακό DNA*

Τα μιτοχόνδρια είναι οργανίδια υπεύθυνα για την παραγωγή ενέργειας και παίζουν σημαντικό ρόλο σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες (Fukunaga 2021, Roger et al 2017). Τα μιτοχόνδρια έχουν το δικό τους γονιδίωμα (mtDNA) το οποίο αντιγράφεται ανεξάρτητα από το πυρηνικό και αλλαγές στη σύσταση του όπως σημειακές μεταλλάξεις, ελλείψεις και αλλαγές στον αριθμό αντιγράφων του (mitochondrial DNA copy number, mtDNAcn) μπορεί να οδηγήσουν στην εμφάνιση (μιτοχονδριακών) ασθενειών (Fukunaga 2021). Η ορθή λειτουργία των μιτοχονδρίων είναι απαραίτητη για την φυσιολογική έκβαση της εγκυμοσύνης (Moren et al 2014). Ο mtDNAcn είναι ένας ευαίσθητος βιοδείκτης που αποτυπώνει την έκθεση σε στρες. Μία πρόσφατη μελέτη έδειξε πως η έκθεση της μητέρας σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως μία φυσική καταστροφή, κατά την κύηση μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στο mtDNAcn του νεογνού κατά την γέννηση (Mendoza-Ortega et al 2021).

## Σκοπός της Εργασίας

Σύμφωνα με την υπόθεση DOHaD, το ΧΒΓ και η προωρότητα αποτελούν δείκτες έκθεσης σε στρεσογόνο ενδομήτριο περιβάλλον και αυτές οι πρώιμες εμπειρίες μπορούν να επηρεάσουν τη φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και να αυξήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης προβλημάτων υγείας στο μέλλον. Η έκθεση σε στρες κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στη λειτουργία του άξονα ΥΓΕ και στη νευροενδοκρινική απόκριση στο στρες. Η εξέταση γενετικών, επιγενετικών και μιτοχονδριακών παραγόντων που σχετίζονται με τον πρόωρο τοκετό, το ΧΒΓ και την απόκριση του οργανισμού στο στρες μπορεί να βοηθήσει στην κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών που διέπουν το φαινόμενο και στην ανάπτυξη κατάλληλων παρεμβάσεων. Παραλλαγές σε γονίδια του ανοσοποιητικού συστήματος των νεογνών (*MBL2*) έχουν συσχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού. Παραλλαγές και τα επίπεδα μεθυλίωσης γονιδίων του άξονα ΥΓΕ (*FKBP5*) και του σεροτονινεργικού συστήματος (*SLC6A4*) έχουν συσχετιστεί με την απόκριση του ατόμου στο στρες, ενώ ο mtDNAcn αποτελεί έναν ευαίσθητο δείκτη έκθεσης στο στρες.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η ύπαρξη μιας πιθανής συσχέτισης μεταξύ ΧΒΓ/προωρότητας με γενετικούς, επιγενετικούς και μιτοχονδριακούς δείκτες που συνδέονται με την απόκριση του οργανισμού στο στρες. Για αυτό τον σκοπό σε έναν πληθυσμό μελέτης που αποτελούνταν από ΧΒΓ/πρόωρα και τελειόμηνα/φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά (controls) μελετήθηκαν 1) παραλλαγές και πολυμορφισμοί των γονιδίων *SLC6A4*, *MBL2* και *FKBP5*, 2) το μοτίβο μεθυλίωσης 18 και 27 θέσεων CpG στους υποκινητές των γονιδίων *FKBP5* και *SLC6A4*, αντίστοιχα και 3) ο mtDNAcn.



## Υλικά και Μέθοδοι

### Πληθυσμός Έρευνας

Ο πληθυσμός της μελέτης αποτελείται από 135 νεογνά τα οποία εντάχθηκαν στη μελέτη σε δύο διακριτά χρονικά διαστήματα. Αρχικά συμμετείχαν στη μελέτη 83 νεογνά που γεννήθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα» και στο Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «Ιπποκράτειο» από τον Ιούλιο 2014 μέχρι τον Ιούλιο 2018. Στο επόμενο στάδιο της μελέτης συμμετείχαν 52 νεογνά που γεννήθηκαν στο Γενικό Νοσοκομείο Αθηνών «Αλεξάνδρα» από τον Σεπτέμβριο 2020 μέχρι τον Απρίλιο 2022. Για κάθε νεογνό λήφθηκε ιατρικό ιστορικό που περιλάμβανε τα παρακάτω στοιχεία: εβδομάδα κύησης, βάρος γέννησης, φύλο, τρόπος σύλληψης, τρόπος τοκετού, ενδομήτρια ανάπτυξη. Η ύπαρξη χρωμοσωμικών ανωμαλιών αποτέλεσε κριτήριο αποκλεισμού από την μελέτη. Οι γονείς των νεογνών ενημερώθηκαν και έδωσαν την συγκατάθεση τους για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, με τα στοιχεία όλων των συμμετεχόντων να είναι ανώνυμα. Το πρωτόκολλο της μελέτης έχει εγκριθεί από το Διοικητικό Συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Αλεξάνδρα» (Αρ. Πρωτ. 257/29-03-2019) και το Επιστημονικό Συμβούλιο του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Αλεξάνδρα» (Αρ. Πρωτ. 768/07-12-2021).

### Κατηγοριοποίηση νεογνών

Τα νεογνά που συμμετείχαν στη μελέτη κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες. Η μία ομάδα αποτελούνταν από πρόωρα ή/και χαμηλού βάρους γέννησης νεογνά και η άλλη ομάδα αποτελούνταν από τελειόμηνα φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά (ομάδα ελέγχου – controls). Χαμηλού βάρους γέννησης θεωρούνται τα νεογνά με βάρος γέννησης < 2500 g (WHO 2022) ενώ φυσιολογικά θεωρούνται τα νεογνά με βάρος γέννησης  $\geq$  2500 g. Πρόωρα θεωρούνται τα νεογνά με ηλικία κύησης  $\leq$  37 εβδομάδων (Quinn et al 2016) ενώ τελειόμηνα τα νεογνά με ηλικία κύησης > 37 εβδομάδων. Στο πρώτο στάδιο της μελέτης (Ιούλιος 2014 – Ιούλιος 2018) συμμετείχαν 53 πρόωρα ή/και χαμηλού βάρους γέννησης και 30 τελειόμηνα φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά και στο δεύτερο στάδιο της μελέτης (Σεπτέμβριος 2020 – Απρίλιος 2022) συμμετείχαν 35 πρόωρα ή/και χαμηλού βάρους γέννησης και 17 τελειόμηνα φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά.

### Συλλογή των δειγμάτων

Δείγματα αίματος συλλέχθηκαν από όλα τα νεογνά που συμμετείχαν στην μελέτη στο πλαίσιο των εξετάσεων τους μετά από ενημέρωση και σύμφωνη γνώμη των γονέων. Η συλλογή πραγματοποιήθηκε από το ιατρικό και νοσηλευτικό προσωπικό των μονάδων. Τα δείγματα φυλάσσονται σε σωληνάρια EDTA στους -20 °C.

### **Απομόνωση DNA**

Από τα δείγματα περιφερικού αίματος που συλλέχθηκαν απομονώθηκε γενωμικό DNA. Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε με την χρήση διαφορετικών τεχνικών στα δύο στάδια της μελέτης. Στο πρώτο στάδιο η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του QiAmp DNA MINI Kit (Qiagen, cat. No. 51304) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η απομόνωση DNA στο πρώτο στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Ζωή Παπαδοπούλου στο πλαίσιο της διδακτορικής της διατριβής. Η απομόνωση DNA στο δεύτερο στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Maxwell™ 16 Blood Purification Kit (Maxwell, cat. No. AS1010) και του μηχανήματος Maxwell™ 16 (Maxwell, cat. No. AS1000). Η απομόνωση DNA στο δεύτερο στάδιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γενετικής του Γενικού Νοσοκομείου Αθηνών «Αλεξάνδρα» από την κ. Άντρια Σπαθή στο πλαίσιο της διπλωματικής της διατριβής. Η αξιολόγηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας του απομονωμένου DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση φωτομέτρου Nanodrop™ 2000 (Thermo Scientific, cat. No. ND-2000C).

### **Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction - PCR)**

Η PCR αποτελεί μια ισχυρή, *in vitro*, τεχνική ενίσχυσης μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας DNA από μία μικρή ποσότητα γενετικού υλικού. Η PCR μιμείται μέχρι ένα βαθμό τη φυσική διαδικασία αναδιπλασιασμού του DNA, καθώς μία θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση βάσει ενός δίκλωνου τοπικά αποελικωμένου τεμαχίου DNA (εκμαγείο, DNA template) και παρουσία ενός ζεύγους αντιπαράλληλων εκκινητών (primers), ιόντων  $Mg^{++}$  και των τεσσάρων dNTP's συνθέτει έναν μεγάλο αριθμό νέων μορίων DNA ως προς το τμήμα του εκμαγείου που αφορίζεται από τους εκκινητές. Για να πραγματοποιηθεί η αποδιάταξη του DNA, ώστε να προσδεθούν οι εκκινητές και να δράσει η DNA πολυμεράση χρειάζεται η επώαση των σωλήνων αντίδρασης σε διαφορετικές θερμοκρασίες που πραγματοποιείται σε ειδικά μηχανήματα που ονομάζονται θερμοκυκλοποιητές. Αρχικά, συνήθως, το πρώτο στάδιο αφορά την επώαση στους 95 °C ώστε να πραγματοποιηθεί η αρχική αποδιάταξη του DNA, και στη συνέχεια ακολουθούν κύκλοι (25-35 συνήθως) των επόμενων τριών σταδίων με σκοπό διαδοχικά την αποδιάταξη του εκμαγείου DNA, την σύνδεση του εκμαγείου με τους εκκινητές και την επιμήκυνση των εκκινητών. Ακολουθεί, τέλος, ένα στάδιο επιμήκυνσης στους 72 °C για 10 λεπτά (Mullis 1990, Sambrook & Russell 2001). Στη συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε PCR με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών για να ενισχυθούν 1) η περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *SLC6A4*, στην οποία εντοπίζεται ο 5HTTLPR και ο rs25531, και 2) η περιοχή του εξωνίου 1 του γονιδίου *MBL2*, στην οποία εντοπίζονται οι rs1800450 και rs1800451. Η σύσταση της αντίδρασης αναγράφεται στον Πίνακα 1 ενώ οι αλληλουχίες των

εκκινητών, το θερμικό προφίλ και οι κύκλοι της αντίδρασης αναγράφονται στον Πίνακα 2. Σε κάθε αντίδραση υπήρχε και ένας αρνητικός μάρτυρας. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25  $\mu\text{L}$  με τη χρήση του KAPA Taq PCR Kit (Sigma Aldrich, cat. No. KK1015), σε θερμοκυκλοποιητή T100 (Bio-rad, cat. No. 1861096).

**Πίνακας 1.** Σύσταση αντίδρασης PCR

| Αντιδραστήριο                            | Δείγμα DNA                         | Αρνητικός μάρτυρας                 |
|--|------------------------------------|------------------------------------|
| KAPA Buffer A (10X)                      | 2,5 $\mu\text{L}$                  | 2,5 $\mu\text{L}$                  |
| dNTPs (25 mM/each)                       | 0,2 $\mu\text{L}$                  | 0,2 $\mu\text{L}$                  |
| Forward primer (20 $\mu\text{M}$ )       | 0,5 $\mu\text{L}$                  | 0,5 $\mu\text{L}$                  |
| Reverse primer (20 $\mu\text{M}$ )       | 0,5 $\mu\text{L}$                  | 0,5 $\mu\text{L}$                  |
| DNA template                             | 3 $\mu\text{L}$                    | -                                  |
| KAPA Taq polymerase (5U/ $\mu\text{L}$ ) | 0,1 $\mu\text{L}$                  | 0,1 $\mu\text{L}$                  |
| Sterile water (PCR grade)                | 18,2 $\mu\text{L}$                 | 21,2 $\mu\text{L}$                 |
| <b>Total volume</b>                      | <b>25 <math>\mu\text{L}</math></b> | <b>25 <math>\mu\text{L}</math></b> |

**Πίνακας 2.** Αλληλουχίες εκκινητών και θερμικό προφίλ PCR

| Γονίδιο       | Αλληλουχία εκκινητών   | Θερμικό προφίλ   |
|---------------|--|--|
| <i>SLC6A4</i> | F: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATGC-3'<br>R: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'        | 95 °C 5min<br>95 °C 30sec<br>60 °C 30sec<br>72 °C 1min<br>72 °C 10min<br>4 °C $\infty$ |
| <i>MBL2</i>   | F: 5'-GGACAGAGGGGGCATGCTCGGTAAAT-3'<br>R: 5'-CAGAACAGCCCAACACGTACCTGG-3' |  |

### Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν μικρές ειδικές αλληλουχίες (συνήθως 4-8 nt) στο εσωτερικό των μορίων DNA και τα τέμνουν στη συγκεκριμένη θέση (Roberts 1976). Στη παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BanI*, *MboII* και *MspI* για την ανίχνευση των παραλλαγών rs1800450 και rs1800451 που εντοπίζονται στο εξώνιο 1 του γονιδίου *MBL2*, και του rs25531 που εντοπίζεται στον υποκινητή γονιδίου *SLC6A4*, αντίστοιχα. Προστέθηκε 1  $\mu\text{L}$  ενζύμου σε 10  $\mu\text{L}$  PCR προϊόντος και ακολούθησε επώαση για 15 min – 60 min. Μετά την επώαση ακολούθησε ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης, και ανάλογα με το

μοτίβο των θραυσμάτων που παρατηρείται στο πήκτωμα έγινε και η ταυτοποίηση των παραλλαγών. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών θραυσμάτων (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) (Saiki et al 1985). Πληροφορίες για την προέλευση των ενζύμων, τις αλληλουχίες που αναγνωρίζουν και τις συνθήκες επώασης αναγράφονται στον πίνακα 3.

**Πίνακας 3.** Στοιχεία περιοριστικών ενδονουκλεασών

| Ένζυμο | Αλληλουχία αναγνώρισης                       | Συνθήκες επώασης | SNV (γονίδιο)                | Εταιρεία (Cat. No.) |
|--------|--|------------------|------------------------------|---------------------|
| BanI   | 5'...G↓GYRCC...3'<br>3'...CCRYG↑G...5'       | 37°C/60 min      | rs1800450<br>( <i>MBL2</i> ) | NEB<br>(R0118S)     |
| MboII  | 5'...GAAGA(N)8↓...3'<br>3'...CTTCT(N)7↑...5' | 37°C/15 min      | rs1800451<br>( <i>MBL2</i> ) | Takara<br>(1145A)   |
| MspI   | 5'...C↓CGG...3'<br>3'...GGC↑C...5'           | 37°C/60 min      | rs25531<br>( <i>SLC6A4</i> ) | Takara<br>(1150A)   |

#### Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση αποτελεί μία μέθοδο διαχωρισμού των νουκλεϊκών οξέων, στην οποία τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA μετακινούνται ανάμεσα από το ημι-στερεό πήκτωμα αγαρόζης σύμφωνα με το μοριακό τους μέγεθος (Sambrook & Russell 2001). Για την παρατήρηση του DNA στο πήκτωμα κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία (UV) είναι απαραίτητη η προσθήκη μιας χρωστικής που προσδένεται στα νουκλεϊκά οξέα, όπως π.χ. το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Στην παρούσα μελέτη η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για την ταυτοποίηση του γονοτύπου της 5HTTLPR, καθώς το μέγεθος των ζωνών που παρατηρούνται στο PCR προϊόν υποδηλώνει την παρουσία του μικρού ή μεγάλου αλληλομόρφου, και επίσης για την ταυτοποίηση των παραλλαγών rs25531, rs1800450 και rs1800451, σύμφωνα με τα μεγέθη των θραυσμάτων DNA που παρατηρούνται μετά την πέψη των προϊόντων PCR με τα περιοριστικά ένζυμα που αναφέρονται στην προηγούμενη ενότητα. Χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης 3% w/v με προσθήκη 0,5 µg/mL EtBr, ρυθμιστικό διάλυμα TAE 1X [40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA], «φορτώθηκαν» 10-15 µL προϊόντος PCR (μαζί με Ficol loading dye 1X – αρχικός όγκος 4X) και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν για 90-120 min στα 55-120V και ακολούθησε παρατήρηση και φωτογράφιση του πηκτώματος.

#### Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-time Polymerase Chain Reaction – real time PCR)

Η real time PCR είναι μια τεχνική που βασίζεται πάνω στην ίδια φιλοσοφία με την συμβατική PCR αλλά επιτρέπει επιπλέον την παρακολούθηση της ενίσχυσης της αλληλουχίας

στόχου κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και όχι στο τέλος της. Αυτό γίνεται εφικτό με την προσθήκη στο διάλυμα της αντίδρασης μορίων σήμανσης ή ανιχνευτών (probes) των οποία φέρουν μια φθορίζουσα χρωστική η οποία ανιχνεύεται από τον θερμοκυκλοποιητή και έτσι η ένταση φθορισμού αντανακλά την ποσότητα του συντιθέμενου DNA. Η real time PCR έχει πολλές εφαρμογές, μεταξύ των οποίων είναι και η ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης καθώς και η ανίχνευση SNVs (Kubista et al 2006). Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκε real time PCR με: 1) TaqMan probes για την ανίχνευση της παραλλαγής rs1360780 (T>C) του γονιδίου *FKBP5* και 2) η χρωστική SYBR™ green για την μελέτη της μεταβολής του mtDNAcp.

Η γονοτύπιση SNVs με τη χρήση TaqMan assay βασίζεται στη χρήση δύο TaqMan probes, οι οποίοι διαφέρουν στην αλληλουχία και στο φθοριόχρωμα το οποίο φέρουν, και μέσω της αναλογίας των σημάτων που εκπέμπουν είναι δυνατός ο προσδιορισμός του αλληλομόρφου που υπάρχει στην αλληλουχία. Η ανάλυση της παραλλαγής rs1360780 (T>C), πραγματοποιήθηκε με τη χρήση δοκιμασίας TaqMan (Thermo Assay ID: C\_8852038\_10, #4351379), βάσει των οδηγιών του κατασκευαστή και με τη χρήση του μηχανήματος StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA, cat No. 4376357) και του StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, USA).

Η μελέτη του mtDNAcp στο περιφερικό αίμα των νεογνών πραγματοποιήθηκε με real time PCR χρησιμοποιώντας 10 ng γονιδιωματικού DNA, 1x Universal SYBR Green Supermix (Kapa Biosystems, #KK 4602) και 400 nM εκκινητών. Οι αντιδράσεις εκτελέστηκαν σε σύστημα ανίχνευσης PCR πραγματικού χρόνου CFX96 (Bio-Rad, cat No. 4376357). Χρησιμοποιήθηκαν ειδική εκκινητές για το πυρηνικό DNA: *GAPDH* Forward 5'-GTGGTCTCTCTCTGACTTCAACA-3', *GAPDH* Reverse 5'- ACCACCCCTGTTGCTGTAGCC-3', και ειδικοί εκκινητές για το mtDNA (Chen et al 2015): *L394* Forward 5'-CACCAGCCCCTAACAGATTTTC-3', *H475* Reverse 5'- GGGTTGTATTGATGATGAGATTAGT-3'. Το θερμικό προφίλ της PCR ήταν το ακόλουθο: 95°C για 10 min και στη συνέχεια 40 κύκλοι από 95°C για 10 s, 60°C για 30 s και 72°C για 30 s. Το *GAPDH* χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς για τον υπολογισμό των σχετικών τιμών έκφρασης του mtDNAcp σε κάθε δείγμα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Ο κύκλος στον οποίο ανιχνεύθηκε το προϊόν ορίζεται ως Ct. Οι τιμές Ct που δόθηκαν από την real time PCR για το mtDNA κανονικοποιήθηκαν ως προς τις τιμές Ct του γονιδίου αναφοράς (*GAPDH*) και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν με τη μέθοδο  $2^{-\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen 2001). Η μελέτη του

mtDNAcn έγινε σε συνεργασία και υπό την καθοδήγηση της ερευνητικής ομάδας της Δρ. Μ. Φίλιου (Εργαστήριο Βιοχημείας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών).

### **Ανάλυση μεθυλίωσης με pyrosequencing CpG assay**

Η μελέτη της μεθυλίωσης με τη μέθοδο pyrosequencing βασίζεται στην αρχή της αλληλούχισης μέσω σύνθεσης (sequencing by synthesis). Αρχικά, είναι απαραίτητη η μετατροπή όλων των μη μεθυλιωμένων κυτοσινών σε ουρακίλες μέσω  $\text{NaHSO}_3$  (bisulfite conversion). Η ύπαρξη της μεθυλομάδας εμποδίζει της μεθυλιωμένες κυτοσίνες να υποστούν τέτοια μετατροπή. Στη συνέχεια απαιτείται να πραγματοποιηθεί μια PCR με εκκινητές που θα περιλαμβάνουν την περιοχή ενδιαφέροντος, στην οποία ο ένας εκκινητής θα είναι βιοτυνιλιωμένος ώστε να δημιουργούν στη συνέχεια μονόκλωνες βιοτυνιλιωμένες αλυσίδες που θα λειτουργήσουν ως εκμαγείο για την αντίδραση pyrosequencing (Harrington et al 2013). Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης σε 3 CpG θέσεις εντός του ιντρονίου 7 του γονιδίου FKBP5, 18 θέσεις εντός της περιοχής υποκινητή του γονιδίου FKBP5 και 27 θέσεις εντός της περιοχής υποκινητή του γονιδίου SLC6A4. Αναλύθηκαν συνολικά 39 δείγματα νεογνών που προέρχονταν και από τις 2 φάσεις της μελέτης. Οι συγκεκριμένες περιοχές CpG που εξετάστηκαν βρίσκονταν σε σημαντικές ρυθμιστικές περιοχές, συμπεριλαμβανομένου του στοιχείου GRE στο ιντρόνιο 7 του γονιδίου *FKBP5* (chr6:35590701-35590799, Human hg38 Assembly), της περιοχής υποκινητή του *FKBP5* (chr6:35573585-35728583, Human hg38 Assembly) και μιας πλούσιας σε CpG περιοχής του υποκινητή του *SLC6A4* (chr17:30235732-30235940, Human hg38 Assembly).

Τα δείγματα DNA υπέστησαν bisulfite conversion χρησιμοποιώντας το EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, cat. No. 59104) ακολουθώντας το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Μετά την χημική τροποποίηση, το DNA αναμίχθηκε με 1,2  $\mu\text{M}$  από κάθε εκκινητή και ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας το PyroMark PCR kit MasterMix (Qiagen, Cat. No. 978705), σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν με το λογισμικό PyroMark Assay Design Software (Qiagen). Πληροφορίες για τους εκκινητές αυτών των γονιδιακών περιοχών μπορούν να βρεθούν στον πίνακα 4. Για κάθε δείγμα, οι PCR πραγματοποιήθηκαν με χρήση του PyroMark PCR kit (Qiagen, cat No. 978703) υπό τις ακόλουθες συνθήκες: αρχική ενεργοποίηση PCR (95 °C για 15 λεπτά) και 45 κύκλοι ενίσχυσης (94 °C για 30 δευτερόλεπτα, 56 °C για 30 δευτερόλεπτα και 72 °C για 30 δευτερόλεπτα). Η επιμήκυνση συνεχίστηκε για 10 λεπτά στους 72 °C μετά τον τελευταίο κύκλο. Όλα τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, χρωματισμένα με βρωμιούχο αιθίδιο. Τα επίπεδα μεθυλίωσης του

DNA για όλες τις CpG θέσεις αξιολογήθηκαν με τη χρήση του PyroMark Q24 pyrosequencer, σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή (Qiagen, CA). Τα αποτελέσματα του pyrosequencing αναλύθηκαν με τη χρήση του λογισμικού PyroMark analysis 2.0.7 (Qiagen). Η μελέτη του επιπέδων μεθυλίωσης έγινε σε συνεργασία και υπό την καθοδήγηση με την ερευνητική ομάδα της Δρ. Α. Σγουρού και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Βιολογίας του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου.

**Πίνακας 4.** Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση μεθυλίωσης.

| Γονίδιο                    | Αλληλουχίες εκκινητών  |
|----------------------------|--|
| <i>FKBP5</i> (intron 7)    | 5'-GGATTTGTAGTTGGGATAATAATTTGG-3' (Forward)<br>5'-ATTCCCTTATTTATTCCTAAACTTATTCTT-3' (Reverse-5' βιοτυνιλιωμένος)<br>5'-GGAGTTATAGTGTAGGTTTT-3' (Sequencing)                                      |
| <i>FKBP5</i> (υποκινητής)  | 5'-GGAGGGGTAGTGTTTTATAGAGA-3' (Forward)<br>5'-CCCTTACCCCTACTCCCCTAACCCCTCAA-3' (Reverse-5' βιοτυνιλιωμένος)<br>5'-GGGGAGGGGTTTTATTG-3' (Sequencing)  |
| <i>SLC6A4</i> (υποκινητής) | 5'-GGTTTTATATGGTTTGATTTTTAGATAG-3' (Forward)<br>5'-ACAAAAAACCACACCTACTCCTTAT-3' (Reverse-5' βιοτυνιλιωμένος)<br>5'-ATGGTTTGATTTTTAGATAGT-3' (Sequencing)<br>5'-GTTTTAGTTGGATGGGG-3' (Sequencing) |

#### Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) και της γλώσσας προγραμματισμού R (έκδοση 4.2.0, <https://www.r-project.org/>). Όλα τα δεδομένα εξετάστηκαν ως προς την κανονικότητα της κατανομής με τα τεστ D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilk και Kolmogorov-Smirnov, και όσα σύνολα δεδομένων δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή αναλύθηκαν με μη παραμετρικά στατιστικά τεστ.

## Πειραματικά Αποτελέσματα

### Δημογραφικά Στοιχεία

Τα νεογνά κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο ομάδες, σε αυτά που γεννήθηκαν πρόωρα ή/και με χαμηλό βάρος γέννησης και σε αυτά που γεννήθηκαν τελειόμηνα με φυσιολογικό βάρος γέννησης και λειτουργούν ως ομάδα ελέγχου (controls). Συνολικά, στην μελέτη συμμετείχαν 88 πρόωρα ή/και χαμηλού βάρους γέννησης και 47 τελειόμηνα φυσιολογικού βάρους γέννησης νεογνά (Πίνακας 5). Οι διακριτές μεταβλητές παρουσιάζονται ως N (%), ενώ οι συνεχείς ως μέσος όρος  $\pm$ SD. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των μεταβλητών μεταξύ των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών και των controls χρησιμοποιώντας τους στατιστικούς ελέγχους t-test και  $\chi^2$  για τις συνεχείς και διακριτές μεταβλητές, αντίστοιχα, και τους μη παραμετρικούς στατιστικούς ελέγχους Mann-Whitney και Fisher's exact test για τις συνεχείς και διακριτές μεταβλητές, αντίστοιχα, στις περιπτώσεις που τα δεδομένα δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Η χρήση υποβοηθούμενης αναπαραγωγής, η (έκτακτη) καισαρική τομή, και το χαμηλό βάρος για την ηλικία κύησης (SGA) ήταν συχνότερα στην ομάδα των μικρού βάρους γέννησης/πρόωρων νεογνών από ότι στην ομάδα ελέγχου και η διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν στατιστικά σημαντική ( $p < 0.05$ ).

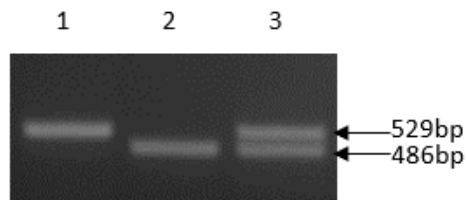


**Πίνακας 5.** Χαρακτηριστικά του πληθυσμού έρευνας. IVF: in vitro fertilization, AGA: appropriate for gestational age. SGA: small for gestational age

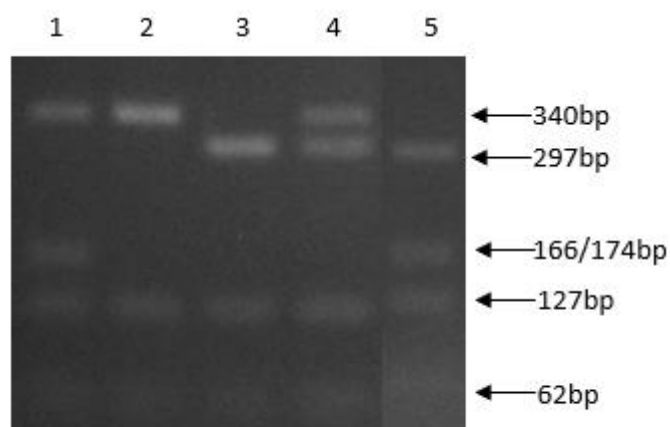
|                                       | Σύνολο<br>(N=135)           | Χαμηλό Βάρος<br>Γέννησης/Πρωωρότητα |                             | p-value           |
|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-------------------|
|                                       |                             | Ναι (N=88)                          | Όχι (N=47)                  |                   |
|                                       | N(%) ή<br>Μέσος όρος<br>±SD | N(%) ή Μέσος<br>όρος ±SD            | N(%) ή<br>Μέσος όρος<br>±SD |                   |
| Ηλικία κύησης (σε εβδομάδες)          | 35.8 ± 3.03                 | 34.4 ± 2.78                         | 38.5 ± 0.79                 | <b>&lt;0.0001</b> |
| Βάρος γέννησης (g)                    | 2313 ± 742.2                | 1877 ± 479.1                        | 3130 ± 351.8                | <b>&lt;0.0001</b> |
| Φύλο                                  |                             |                                     |                             | 0.9562            |
| Αρσενικό                              | 59 (43.70%)                 | 38 (43.18%)                         | 21 (44.68%)                 |                   |
| Θηλυκό                                | 74 (54.81%)                 | 48 (54.54%)                         | 26 (55.32%)                 |                   |
| Τρόπος σύλληψης                       |                             |                                     |                             | <b>0.0329</b>     |
| Φυσιολογικός                          | 121<br>(89.63%)             | 75 (85.23%)                         | 46 (97.87%)                 |                   |
| IVF                                   | 13 (9.63%)                  | 12 (13.64%)                         | 1 (2.13%)                   |                   |
| Τρόπος τοκετού                        |                             |                                     |                             | <b>0.0002</b>     |
| Φυσιολογικός                          | 31 (22.96%)                 | 11 (12.5%)                          | 20 (42.55%)                 |                   |
| Καισαρική                             | 102<br>(75.55%)             | 75 (85.23%)                         | 27 (57.44%)                 |                   |
| Προγραμματισμένη/έκτακτη<br>καισαρική |                             |                                     |                             | <b>0.0250</b>     |
| Προγραμματισμένη                      | 33 (32.35%)                 | 20 (19.60%)                         | 13 (48.14%)                 |                   |
| Έκτακτη                               | 30 (29.41%)                 | 26 (34.66%)                         | 4 (14.81%)                  |                   |
| Ενδομήτρια Ανάπτυξη                   |                             |                                     |                             | <b>&lt;0.0001</b> |
| SGA                                   | 57 (42.23%)                 | 48 (54.55%)                         | 9 (19.15%)                  |                   |
| AGA                                   | 78 (57.77%)                 | 40 (45.45%)                         | 38 (80.85%)                 |                   |

#### Ανάλυση παραλλαγών και πολυμορφισμών του γονιδίου *SLC6A4*

Η ανάλυση της 5-HTTLPR πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και της rs25531 (A>G) με Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Αρχικά πραγματοποιήθηκε PCR με σκοπό την ενίσχυση της περιοχής του υποκινητή που περιλαμβάνει τον πολυμορφισμό. Από το PCR προϊόν ένα μέρος ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 3% και απεικονίστηκε με υπεριώδη ακτινοβολία μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο. Η ύπαρξη ζώνης μεγέθους 484 bp παραπέμπει στην παρουσία του αλληλομόρφου S ενώ ζώνης μεγέθους 528 bp στην παρουσία του αλληλομόρφου L. Τα ετερόζυγα δείγματα εμφανίζουν και τις δύο ζώνες (Εικόνα 4). Στη συνέχεια το υπόλοιπο PCR προϊόν υπέστη πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση *MspI* για την ταυτοποίηση της παραλλαγής rs25531. Η πέψη με το συγκεκριμένο περιοριστικό δημιουργεί ένα διακριτό μοτίβο θραυσμάτων που επιτρέπει την ταυτοποίηση των αλληλομόρφων κάθε δείγματος (Εικόνα 5). Αναλυτικά σε ποιο αλληλόμορφο αντιστοιχεί ο κάθε συνδυασμός θραυσμάτων αναγράφεται στον Πίνακα 6. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων δεν εμφάνισε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά (Πίνακας 7). Ο προσδιορισμός του γονοτύπου των δειγμάτων της πρώτης φάσης πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Ζωή Παπαδοπούλου.



**Εικόνα 4.** Αντιπροσωπευτική εικόνα των ζωνών που παρατηρούνται στο πήκτωμα για τον καθορισμό του γονοτύπου του 5HTTLPR. 1) Δείγμα ομόζυγο το μεγάλο (L) αλληλόμορφο. 2) Δείγμα ομόζυγο για το μικρό (S) αλληλόμορφο. 3) Ετερόζυγο δείγμα που παρουσιάζει και τις δύο ζώνες.



**Εικόνα 5.** Αντιπροσωπευτική εικόνα των ζωνών που παρατηρούνται στο πήκτωμα για τον καθορισμό του γονοτύπου του rs25531. Η ζώνη στα 62bp δεν διακρίνεται καλά, ενώ οι ζώνες στα 166bp και 174bp είναι δύσκολο να ξεχωρίσουν λόγω της μικρής διαφοράς τους. 1) Γονότυπος  $L_A/L_G$  2) Γονότυπος  $L_A/L_A$  3) Γονότυπος  $S_A/S_A$  4) Γονότυπος  $L_A/S_A$  5) Γονότυπος  $S_A/L_G$

**Πίνακας 6.** Αναμενόμενα μοριακά βάρη των αλληλομόρφων του rs25531.

| $L_A$  | $L_G$  | $S_A$  | $S_G$  |
|--------|--------|--------|--------|
| 340 bp | 174 bp | 297 bp | 166 bp |
| 127 bp | 166 bp | 127 bp | 131 bp |
| 62 bp  | 127 bp | 62 bp  | 127 bp |
|        | 62 bp  |        |        |

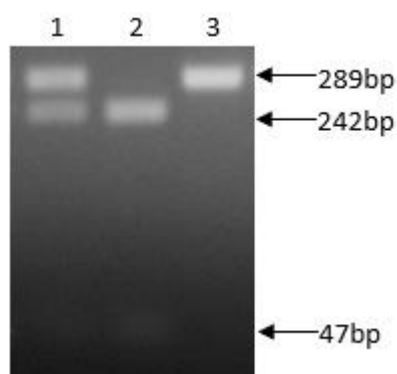
**Πίνακας 7.** Αποτελέσματα ανάλυσης για τον 5HTTLPR και την παραλλαγή rs25531 στις δύο ομάδες μελέτης.

| Παραλλαγή/Πολυμορφισμός | ΧΒΓ/Πρωωρότητα (%) | Controls (%) | p-value |
|-------------------------|--------------------|--------------|---------|
| <b>5HTTLPR</b>          | S/S (26.14%)       | S/S (25.53%) | 0.921   |
|                         | S/L (47.72%)       | S/L (51.07%) |         |
|                         | L/L (26.14%)       | L/L (23.40%) |         |
| <b>rs25531</b>          | A/A (89.77%)       | A/A (97.87%) | 0.164   |
|                         | A/G (10.23%)       | A/G (2.13%)  |         |
|                         | G/G (0%)           | G/G (0%)     |         |

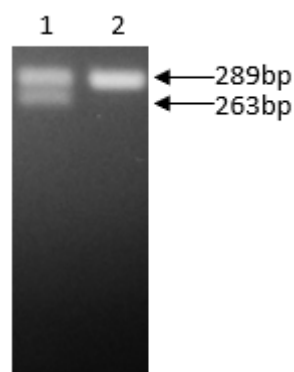
**Ανάλυση παραλλαγών του γονιδίου *MBL2***

Η ανάλυση των παραλλαγών rs1800450 (G>A) και rs1800451 (G>A) του γονιδίου *MBL2* πραγματοποιήθηκε με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). Η περιοχή του εξωνίου 1 του γονιδίου *MBL2* στην οποία εντοπίζονται οι παραλλαγές ενισχύθηκε με PCR, και στην συνέχεια τα προϊόντα της αντίδρασης υπέστησαν πέψεις με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *BanI* και *MboII* για την ανίχνευση των rs1800450 και rs1800451, αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες παραλλαγές εντοπίζονται στα κωδικόνια 54 και 57 και αναφέρονται συχνά ως παραλλαγή B (rs1800450) και C (rs1800451), αντίστοιχα, ενώ το φυσιολογικό αλληλόμορφο αναφέρεται ως αλληλόμορφο A και στις 2 περιπτώσεις. Στην περίπτωση του rs1800450 το αλληλόμορφο A (289 bp) κόβεται σε δύο θραύσματα, μεγέθους 242 και 47 bp, από την *BanI*. Το αλληλόμορφο B αντιθέτως παραμένει άκοπο (289 bp) (Εικόνα 6) και έτσι είναι εφικτός ο προσδιορισμός του γονοτύπου με απλή παρατήρηση του μεγέθους και του αριθμού των ζωνών που παρατηρείται στο πήκτωμα μετά την πέψη. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την rs1800451, όπου η *MboII* κόβει το αλληλόμορφο C σε θραύσματα μεγέθους 263 και 26 bp, ενώ το κανονικό αλληλόμορφο (289 bp) παραμένει μη τεμαχισμένο (Εικόνα 7). Η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο ομάδων εμφάνισε μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης

του αλληλομόρφου C της rs1800451 στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών, με την διαφορά να είναι στατιστικά σημαντική ( $p=0.009$ ) (Πίνακας 8). Ο προσδιορισμός του γονοτύπου των δειγμάτων της πρώτης φάσης πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Ζωή Παπαδοπούλου.



**Εικόνα 6.** Αντιπροσωπευτική εικόνα των ζωνών που παρατηρούνται στο πήκτωμα ύστερα από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *BanI*. Η ζώνη στα 47bp λόγω του μικρού μοριακού βάρους είναι δύσκολο να διακριθεί. 1) Ετερόζυγο δείγμα που παρουσιάζει και τις 3 ζώνες. 2) Ομόζυγο δείγμα για το αλληλόμορφο A. 3) Ομόζυγο δείγμα για το αλληλόμορφο B.



**Εικόνα 7.** Αντιπροσωπευτική εικόνα των ζωνών που παρατηρούνται στο πήκτωμα ύστερα από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *MboII*. Η ζώνη στα 26bp λόγω του πολύ μικρού μοριακού βάρους δεν διακρίνεται. 1) Ετερόζυγο δείγμα που παρουσιάζει και ζώνες στα 289bp και στα 263bp. 2) Ομόζυγο δείγμα για το αλληλόμορφο A.

**Πίνακας 8.** Αποτελέσματα ανάλυσης για τις παραλλαγές rs1800450 και rs1800451

| Παραλλαγή | ΧΒΓ/Πρωωρότητα (%) | Controls (%) | p-value |
|-----------|--------------------|--------------|---------|
| rs1800450 | A/A (62.50%)       | A/A (70.21%) | 0.735   |
|           | A/B (29.55%)       | A/B (23.41%) |         |
|           | B/B (7.95%)        | B/B (6.38%)  |         |
| rs1800451 | A/A (71.59%)       | A/A (93.62%) | 0.009   |
|           | A/C (22.73%)       | A/C (6.38%)  |         |
|           | C/C (5.68%)        | C/C (0%)     |         |

### Αποτελέσματα ανάλυσης παραλλαγών του γονιδίου *FKBP5*

Η παραλλαγή rs1360780 που εδράζεται στο ιντρόνιο 1 του γονιδίου *FKBP5* (rs1360780) αναλύθηκε με τη χρήση TaqMan genotyping assay. Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης μεταξύ των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών και των νεογνών ελέγχου (Πίνακας 9). Ο προσδιορισμός του γονοτύπου των δειγμάτων της πρώτης φάσης πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Ζωή Παπαδοπούλου, ενώ η πλειοψηφία των δειγμάτων της δεύτερης φάσης αναλύθηκε από την κ. Άντρια Σπαθή.

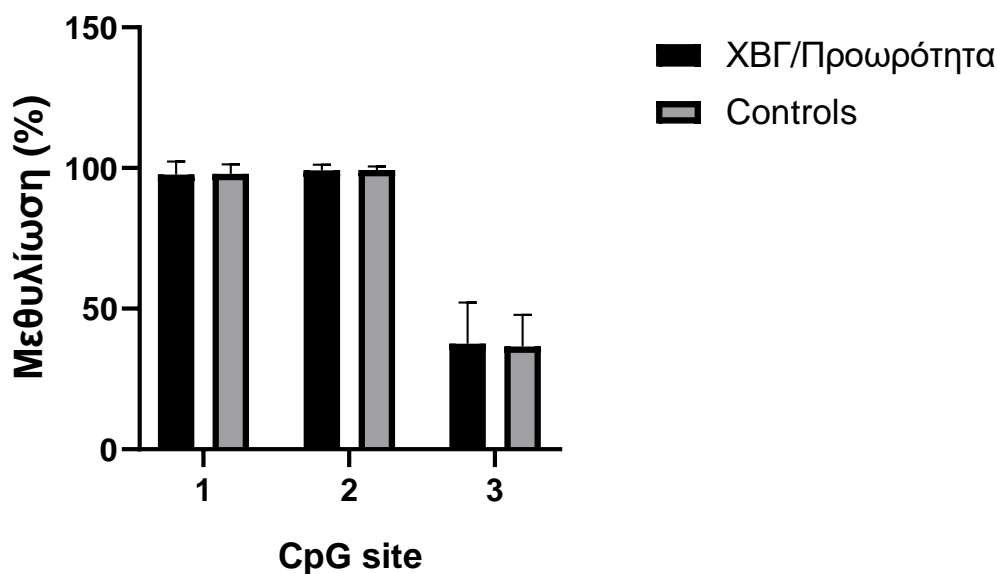
**Πίνακας 9.** Αποτελέσματα ανάλυσης της παραλλαγής rs1360780 και στις δύο ομάδες μελέτης

| Παραλλαγή | ΧΒΓ/Πρωρότητα (%) | Controls (%) | p-value |
|-----------|-------------------|--------------|---------|
| rs1360780 | C/C (39.77%)      | C/C (44.68%) | 0.548   |
|           | C/T (47.73%)      | C/T (48.94%) |         |
|           | T/T (12.50%)      | T/T (6.38%)  |         |

### Αποτελέσματα ανάλυσης μεθυλίωσης

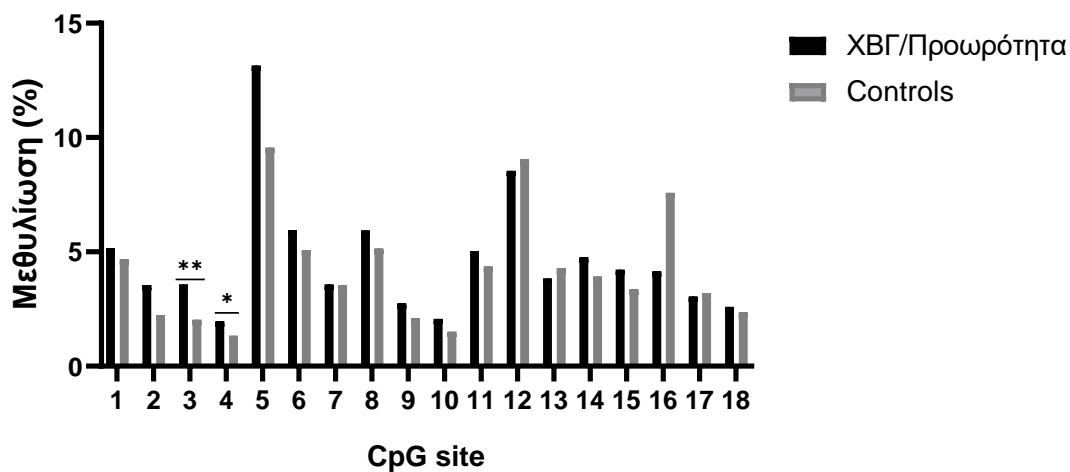
Αναλύθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης μεταξύ ΧΒΓ/πρόωρων νεογνών και controls σε δύο περιοχές του γονιδίου *FKBP5* και σε μία περιοχή του γονιδίου *SLC6A4*. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα υποσύνολο 39 νεογνών (21 ΧΒΓ/πρόωρα, 18 controls) που προερχόταν και από τις δύο φάσεις της μελέτης. Συγκεκριμένα, αναλύθηκε το πρότυπο μεθυλίωσης σε 3 θέσεις CpG εντός του ιντρονίου 7 (Σχήμα 1) και σε 18 θέσεις CpG εντός του υποκινητή (Σχήμα 2) του γονιδίου *FKBP5*. Από τις 3 θέσεις που βρίσκονται στο ιντρόνιο 7 καμία δεν παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, ενώ από τις 18 θέσεις που βρίσκονται στον υποκινητή του γονιδίου *FKBP5*, οι θέσεις 3 και 4 παρουσίασαν στατιστικά σημαντικά διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.0015$  και  $p=0.0244$ , αντίστοιχα) (Σχήμα 3 και Σχήμα 4). Από τις 27 περιοχές CpG που αναλύθηκαν εντός της περιοχής υποκινητή του *SLC6A4* (Σχήμα 5), μόνο η θέση 19 παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων ( $p=0.0068$ ) (Σχήμα 6).

### FKBP5 ιντρόνιο 7

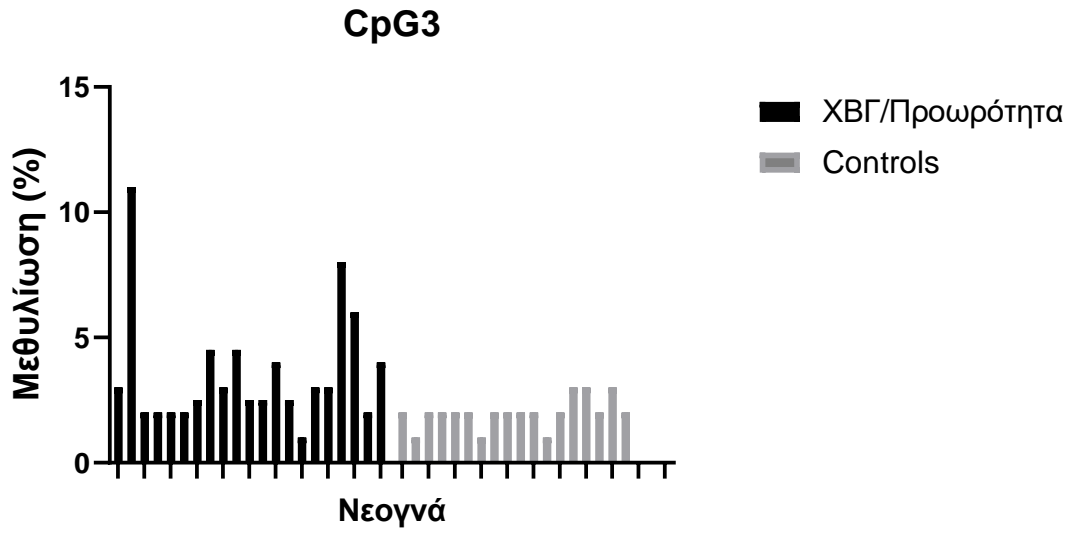


**Σχήμα 1.** Μέσα επίπεδα μεθυλίωσης των δύο ομάδων μελέτης για κάθε θέση CpG στην περιοχή του ιντρονίου 7 του γονιδίου FKBP5.

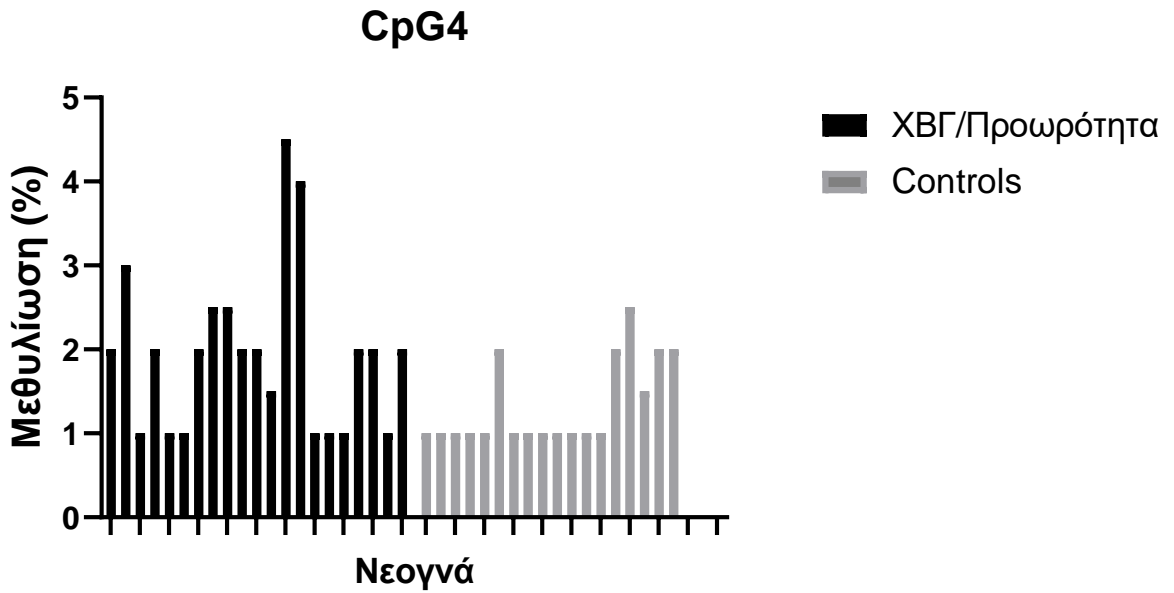
### FKBP5 περιοχή υποκινητή



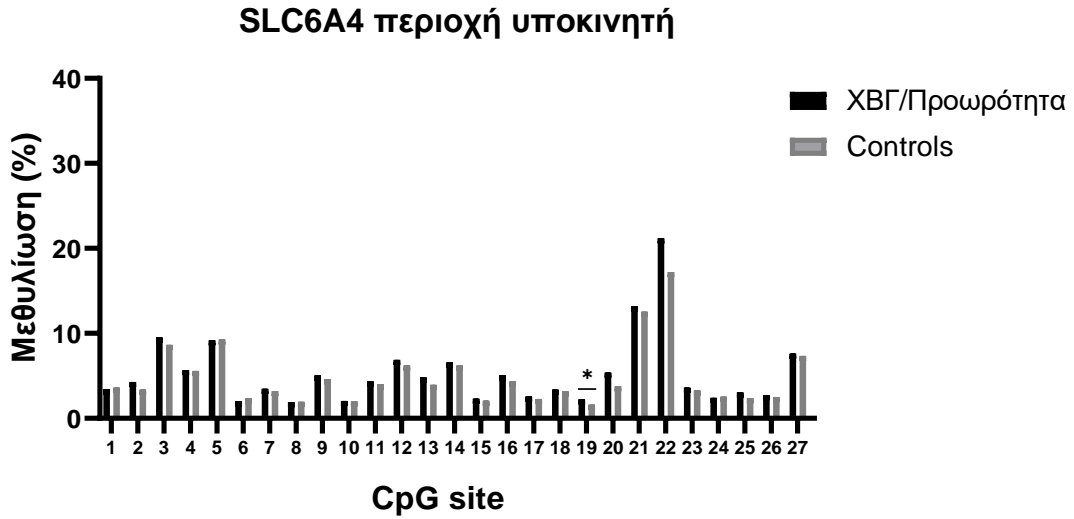
**Σχήμα 2.** Μέσος όρος επιπέδων μεθυλίωσης των δύο ομάδων μελέτης για κάθε θέση CpG στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου FKBP5. Οι θέσεις 3 και 4 παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει  $p \leq 0.05$  και ο διπλός αστερίσκος (\*\*) υποδηλώνει  $p \leq 0.01$ .



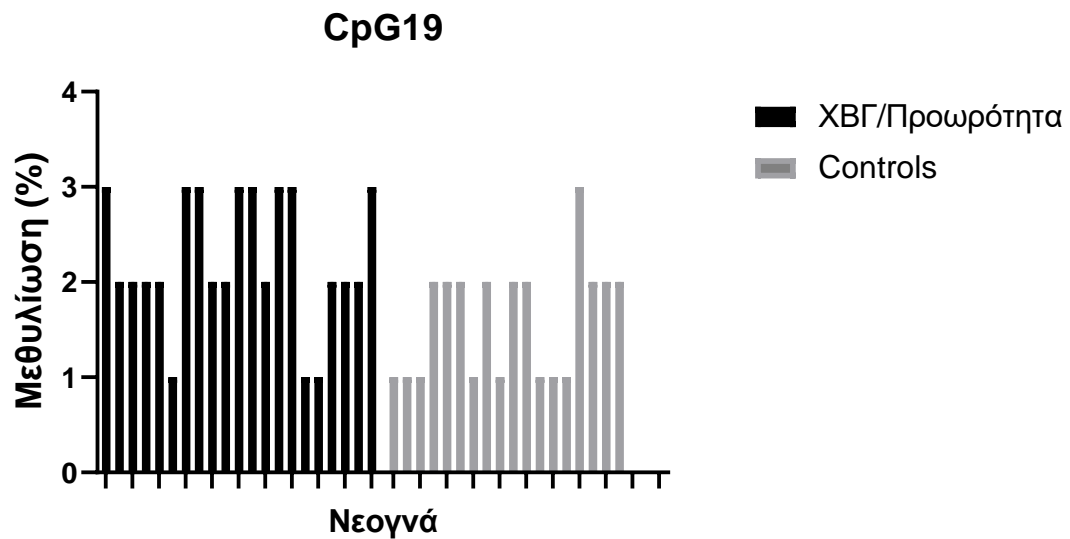
Σχήμα 3. Ποσοστά μεθυλίωσης της θέσης CpG3 για κάθε νεογνό ξεχωριστά.



Σχήμα 4. Ποσοστά μεθυλίωσης της θέσης CpG4 για κάθε νεογνό ξεχωριστά.



**Σχήμα 5.** Μέσος όρος επιπέδων μεθυλίωσης των δύο ομάδων μελέτης για κάθε θέση CpG στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου *SLC6A4*. Η θέση 19 παρουσιάζει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων. Ο αστερίσκος (\*) υποδηλώνει  $p \leq 0.05$ .



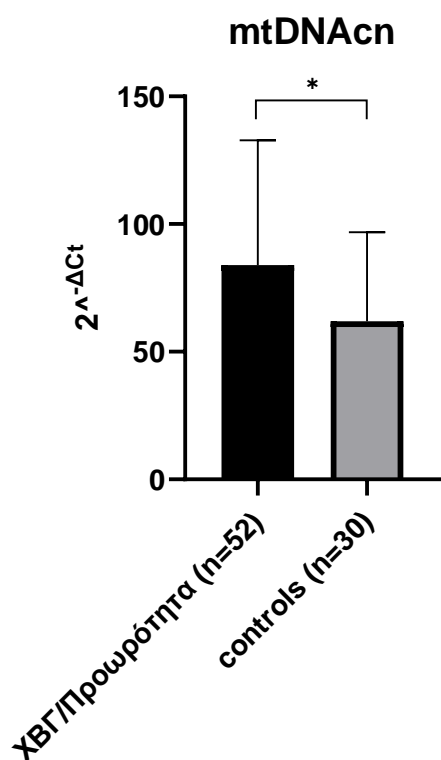
**Σχήμα 6.** Ποσοστά μεθυλίωσης της θέσης CpG19 για κάθε νεογνό ξεχωριστά.



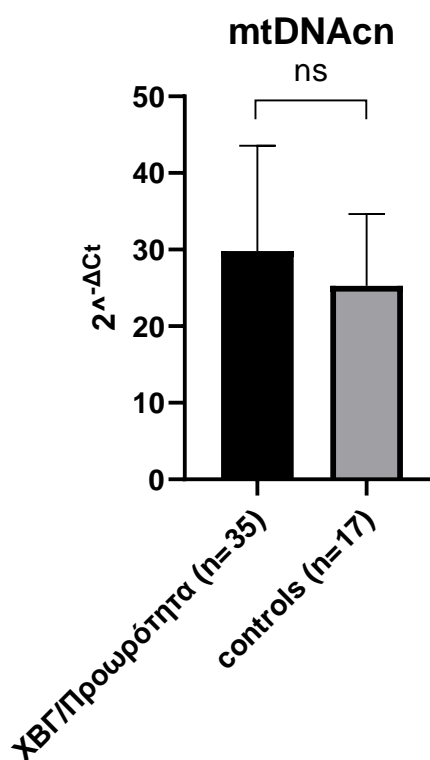
### Αποτελέσματα ανάλυσης μιτοχονδριακού DNA

Ο mtDNAcn μπορεί να αποτελεί ένδειξη ενδομήτριας έκθεσης του νεογνού σε στρες. Επειδή χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικές τεχνικές απομόνωσης DNA στις δύο φάσεις της μελέτης, η σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για κάθε φάση της μελέτης. Οι συγκρίσεις έδειξαν αυξημένες τιμές mtDNAcn στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου και στις δύο φάσεις (Σχήμα 7). Στα νεογνά που προέρχονταν από την πρώτη φάση της μελέτης η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική ( $p=0.0292$ ), ενώ στην σύγκριση μεταξύ των νεογνών της δεύτερης φάσης δεν επιτεύχθηκε στατιστική σημαντικότητα ( $p=0.2275$ ). Η πλειοψηφία των πειραμάτων υπολογισμού του mtDNAcn πραγματοποιήθηκε από την Δρ. Μαριάντζελα Βλαϊκού στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών.

A)



B)



**Σχήμα 7.** Σύγκριση μεταξύ του mtDNAcn A) στα δείγματα νεογνών που συγκεντρώθηκαν κατά την πρώτη φάση της μελέτης ( $p=0.0292$ ) και B) στα δείγματα νεογνών που συγκεντρώθηκαν κατά την δεύτερη φάση της μελέτης ( $p=0.2275$ ).

## Συζήτηση

Η έκθεση σε στρες έχει αρνητικό αντίκτυπο στην υγεία του ατόμου και έχει συνδεθεί με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών (Epel et al 2018, Luo et al 2023). Κάθε άτομο αποκρίνεται και διαχειρίζεται διαφορετικά στρεσογόνες καταστάσεις, και η φυσιολογική και συμπεριφορική αντίδραση του εξαρτάται από το γενετικό, επιγενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο του (Mifsud et al 2011, Sosnowski & Brosnan 2023). Το στρες που βιώνει η μητέρα μπορεί να μεταφερθεί στο νεογνό μέσω διάφορων μηχανισμών (Provencal & Binder 2015) και η γέννηση πρόωρου ή με ΧΒΓ νεογνού μπορεί να υποδηλώνει στρεσογόνο ενδομήτριο περιβάλλον (Lautarescu et al 2020, Miller et al 2017). Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν γενετικοί και επιγενετικοί παράγοντες που συνδέονται με την απόκριση του οργανισμού στο στρες και θα μπορούσαν να αποτελούν παράγοντες κινδύνου ή βιοδείκτες για την γέννηση πρόωρων ή/και ΧΒΓ νεογνών, σε έναν πληθυσμό που αποτελούνταν από 88 ΧΒΓ/πρόωρα και 47 φυσιολογικού βάρους γέννησης τελειόμηνα νεογνά. Αρχικά, συγκρίθηκαν μεταβλητές που αντλήθηκαν από το ιατρικό ιστορικό των συμμετεχόντων και περιλάμβαναν την εβδομάδα κύησης, το βάρος γέννησης, το φύλο, τον τρόπο σύλληψης, τον τρόπο τοκετού και την ενδομήτρια ανάπτυξη. Η σύλληψη με χρήση υποβοηθούμενης αναπαραγωγής ήταν συχνότερη στην ομάδα των ΧΒΓ/πρόωρων νεογνών. Η χρήση τεχνικών υποβοηθούμενης αναπαραγωγής συνδέεται με άγχος και στρες, και σε ορισμένες περιπτώσεις και με κατάθλιψη (Rooney & Domar 2018). Στο δείγμα της συγκεκριμένης μελέτης ο τοκετός με καισαρική τομή ήταν επίσης συχνότερος στα ΧΒΓ/πρόωρα νεογνά. Σύμφωνα με μία συγχρονική (cross-sectional) μελέτη, οι γυναίκες που επιλέγουν καισαρική τομή αναφέρεται ότι είχαν χαμηλότερη κοινωνική υποστήριξη, υψηλότερα επίπεδα άγχους και μεγαλύτερη ευαισθησία στον σωματικό πόνο σε σύγκριση με γυναίκες που επιλέγουν φυσιολογικό τοκετό (Tuschy et al 2018).

Στη συνέχεια μελετήθηκαν πολυμορφισμοί και παραλλαγές γονιδίων που σχετίζονται με την απόκριση του οργανισμού στο στρες και την άμυνα του νεογνού απέναντι σε λοιμώξεις. Το γονίδιο *SLC6A4* κωδικοποιεί τον 5-HTT ο οποίος αποτελεί κύριο συστατικό του σεροτονινεργικού συστήματος απόκρισης στο στρες, και η 5HTTLPR και η rs25531 επηρεάζουν τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης και κατ' επέκταση την απόκριση του οργανισμού στο στρες (Canli & Lesch 2007, Ehli et al 2012, Hu et al 2006, Iurescia et al 2016, Serretti et al 2006). Η μελέτη του πολυμορφισμού 5-HTTLRP και της παραλλαγής rs25531 δεν έδειξε κάποια διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης τους μεταξύ των δύο ομάδων. Στη συνέχεια μελετήθηκε η παραλλαγή rs1360780 που εντοπίζεται στο γονίδιο *FKBP5*. Το

συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της δράσης των GRs (Klengel et al 2013), και η δράση του έχει συνδεθεί με νευροενδοκρινικές και ψυχιατρικές ασθένειες (Binder et al 2008, Binder et al 2004). Η παρουσία του T αλληλομόρφου του rs1360780 έχει συνδεθεί με εμφάνιση αυξημένων επιπέδων στρες σε νεογνά (Raquette et al 2014). Παρόλο που ο γονότυπος T/T εμφανιζόταν συχνότερα στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών, δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά. Αυτό ίσως να οφείλεται και στον μικρό αριθμό δειγμάτων που εμφάνισαν το συγκεκριμένο γονότυπο. Οι τελευταίες παραλλαγές που μελετήθηκαν ήταν δύο SNV στο γονίδιο *MBL2*. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το συγκεκριμένο γονίδιο αποτελεί σημαντικό συστατικό του συστήματος φυσικής ανοσίας των νεογνών και τα επίπεδα έκφρασης της έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για περιγεννητικές λοιμώξεις και πρόωρο τοκετό (Auriti et al 2010, Dzwonek et al 2008, Ozkan et al 2012, Speletas et al 2015, Turner 2003). Τα αλληλόμορφα B και C των rs1800450 και rs1800451 οδηγούν σε μειωμένη έκφραση της MBL και αυξημένο κίνδυνο για πρόωρο τοκετό (Garred et al 2003). Το αλληλόμορφο B δεν εμφάνισε διαφορές στην συχνότητα εμφάνισης του μεταξύ των δύο ομάδων. Αντιθέτως, το αλληλόμορφο C εμφανιζόταν συχνότερα στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών και η διαφορά ήταν στατιστικά σημαντική. Αν και σπάνια, η συγκεκριμένη παραλλαγή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης για αυξημένο κίνδυνο πρόωρου τοκετού, αν και πρέπει να τονιστεί πως οι γενετικές επιδράσεις σε αυτόν τον τομέα έρευνας απαιτούν γονιδιακής κλίμακας (genome wide) προσεγγίσεις στις οποίες μελετώνται πολλοί γενετικοί τόποι σε ολόκληρο το γονιδίωμα.

Ακόμα, μελετήθηκαν τα επίπεδα μεθυλίωσης 18 και 27 CpG θέσεων στους υποκινητές των γονιδίων *FKBP5* και *SLC6A4*, αντίστοιχα. Η μεθυλίωση αυτών των περιοχών συσχετίζεται με την έκθεση των νεογνών σε τραυματικές και στρεσογόνες εμπειρίες, όπως είναι για παράδειγμα η νοσηλεία σε ΜΕΝΝ (Grasso et al 2020, Montirosso et al 2016, Provenzi et al 2015). Η ανάλυση των επιπέδων μεθυλίωσης στον συγκεκριμένο πληθυσμό μελέτης ανέδειξε 2 CpG (CpG3 και CpG4) στον υποκινητή του *FKBP5* και ένα CpG (CpG19) στον υποκινητή του γονιδίου *SLC6A4* που εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα μεθυλίωσης στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών και η διαφορά μεταξύ των ομάδων ήταν στατιστικά σημαντική. Αυτό υποδηλώνει πως περιβαλλοντικοί παράγοντες, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται και το στρες, φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα μεθυλίωσης σημαντικών γονιδίων για την απόκριση του οργανισμού στο στρες. Αξίζει να σημειωθεί πως στα συγκεκριμένα CpG τα επίπεδα μεθυλίωσης ήταν χαμηλά και η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε ένα υποσύνολο του συνολικού πληθυσμού μελέτης (39 δείγματα), ώστε να μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τις διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Τέλος, υπολογίστηκε ο mtDNAcp

στο περιφερικό αίμα όλων των νεογνών που συμμετείχαν στη μελέτη. Τα επίπεδα του mtDNAcn ήταν υψηλότερα στην ομάδα των πρόωρων/ΧΒΓ νεογνών και στις δύο φάσεις της μελέτης, όμως στατιστική σημαντικότητα επιτεύχθηκε μόνο στη πρώτη φάση της μελέτης. Ο mtDNAcn θα μπορούσε να αποτελέσει ενδεικτικό δείκτη έκθεσης στο ενδομήτριο στρες καθώς η έκθεση κατά τη διάρκεια της κύησης σε στρες πιθανώς σχετίζεται με αλλαγές στον mtDNAcn κατά την γέννηση του νεογνού (Mendoza-Ortega et al 2021). Συμπερασματικά, η εύρεση αξιόπιστων δεικτών που σχετίζονται με το ΧΒΓ, την προωρότητα και το ενδομήτριο στρες μπορεί να συμβάλει στην εξατομικευμένη εκτίμηση του κινδύνου για ανεπιθύμητες εκβάσεις της κύησης και στο σχεδιασμό στοχευμένων παρεμβάσεων.

## Περίληψη

Σύμφωνα με την υπόθεση των αναπτυξιακών απαρχών της υγείας και νόσου (DOHaD hypothesis) στρεσογόνες εμπειρίες κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια έχουν αντίκτυπο στην μελλοντική υγεία του ατόμου. Η απόκριση σε στρεσογόνες καταστάσεις περιλαμβάνει την ενεργοποίηση νευροβιολογικών μηχανισμών, με τον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-επινεφριδίων (ΥΥΕ) να διαδραματίζει κεντρικό ρόλο. Οι ατομικές διαφορές που παρατηρούνται στην απόκριση σε στρες καθορίζονται από το γενετικό και περιβαλλοντικό υπόβαθρο του κάθε ατόμου. Το χαμηλό βάρος γέννησης (ΧΒΓ) και η προωρότητα θεωρούνται δείκτες στρεσογόνων ενδομήτριων εμπειριών, που μπορεί να επηρεάσουν την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου και να αυξήσουν μελλοντικά τον κίνδυνο εμφάνισης προβλημάτων υγείας. Στην παρούσα εργασία, σε έναν πληθυσμό μελέτης που αποτελούνταν από ΧΒΓ/πρόωρα και φυσιολογικού βάρους γέννησης τελειόμηνα νεογνά (controls) μελετήθηκαν: Α) παραλλαγές στο γονίδιο *MBL2*, που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που αποτελεί κομμάτι της φυσικής ανοσίας, και έχουν συνδεθεί με αυξημένο κίνδυνο για νεογνικές λοιμώξεις και πρόωρο τοκετό, Β) παραλλαγές, πολυμορφισμοί και τα επίπεδα μεθυλίωσης γονιδίων του άξονα ΥΥΕ (*FKBP5*) και του σεροτονινεργικού συστήματος (*SLC6A4*) που έχουν συσχετιστεί με την απόκριση του ατόμου στο στρες και Γ) ο αριθμός αντιγράφων μιτοχονδριακού DNA (mtDNA<sub>cn</sub>) ο οποίος αποτελεί δείκτη έκθεσης σε στρες. Η παραλλαγή rs1800451 του γονιδίου *MBL2* εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ΧΒΓ/πρόωρων νεογνών και θα μπορούσε να αποτελέσει γενετικό δείκτη αυξημένου κινδύνου ΧΒΓ/προωρότητας. Παρατηρήθηκαν υψηλότερα επίπεδα μεθυλίωσης σε CpGs στους υποκινητές των *SLC6A4* και *FKBP5* στην ομάδα των ΧΒΓ/πρόωρων νεογνών. Ο mtDNA<sub>cn</sub> ήταν υψηλότερος στην ομάδα των ΧΒΓ/πρόωρων νεογνών και θα μπορούσε να αποτελέσει βιοδείκτη της ενδομήτριας έκθεσης του νεογνού σε στρες. Συμπερασματικά, η μελέτη γενετικών και επιγενετικών παραγόντων που σχετίζονται με την προωρότητα, το ΧΒΓ και την απόκριση στο στρες μπορεί να συμβάλει στην κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών του φαινομένου και στην ανάπτυξη κατάλληλων και έγκαιρων παρεμβάσεων.

## Abstract

According to the Developmental Origins of Health and Disease hypothesis (DOHaD) stress during early developmental stages has an impact on future human health. Stress response involves the activation of various neurobiological systems, with the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis being a crucial component in the stress response system. Individual differences in stress response are determined by individual genetic and epigenetic background. Low birth weight (LBW) and prematurity are considered indicators of a stressful intrauterine environment that may affect normal fetal development and increase the risk of future health issues. In the present study in a cohort consisting of LBW/preterm and normal birth weight term neonates (controls) the following genetic and epigenetic factors were studied: A) single nucleotide variants (SNVs) in *MBL2*, a gene that is involved in innate immune defense, that has been associated with an increased risk of neonatal infections and preterm birth, B) SNVs, polymorphisms and methylation levels of genes of the HPA axis (*FKBP5*) and the serotonergic system (*SLC6A4*) that have been associated with the response to stress and C) mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn), which is considered a stress marker. *MBL2* rs1800451 occurs more frequently in the LBW/preterm group of neonates than in controls and could be a potential genetic marker of increased risk of LBW/prematurity. Higher levels of methylation in CpGs in the *SLC6A4* and *FKBP5* promoters were observed in the LBW/preterm group compared to controls. Mitochondrial DNA copy number (mtDNAcn) was higher in the LBW/preterm group and could be indicative of neonatal intrauterine stress exposure. In conclusion, the study of genetic and epigenetic factors associated with prematurity, LBW and stress response may contribute to the understanding of the underlying mechanisms of this phenomenon and the development of appropriate and timely interventions.

## Βιβλιογραφία

### Ξενόγλωσση

- Alexander N, Kirschbaum C, Wankerl M, Stauch BJ, Stalder T, et al. 2018. Glucocorticoid receptor gene methylation moderates the association of childhood trauma and cortisol stress reactivity. *Psychoneuroendocrinology* 90: 68-75
- Alexander N, Kuepper Y, Schmitz A, Osinsky R, Kozyra E, Hennig J. 2009. Gene-environment interactions predict cortisol responses after acute stress: implications for the etiology of depression. *Psychoneuroendocrinology* 34: 1294-303
- Allen AP, Kennedy PJ, Dockray S, Cryan JF, Dinan TG, Clarke G. 2017. The Trier Social Stress Test: Principles and practice. *Neurobiol Stress* 6: 113-26
- Auriti C, Prencipe G, Inglese R, Azzari C, Ronchetti MP, et al. 2010. Role of mannose-binding lectin in nosocomial sepsis in critically ill neonates. *Hum Immunol* 71: 1084-8
- Bancos I, Hatipoglu BA, Yuen KCJ, Chandramohan L, Chaudhari S, Moraitis AG. 2021. Evaluation of FKBP5 as a cortisol activity biomarker in patients with ACTH-dependent Cushing syndrome. *J Clin Transl Endocrinol* 24: 100256
- Barker DJ. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 301: 1111
- Barker DJ. 2007. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261: 412-7
- Barrero-Castillero A, Morton SU, Nelson CA, III, Smith VC. 2019. Psychosocial Stress and Adversity: Effects from the Perinatal Period to Adulthood. *NeoReviews* 20: e686-e96
- Bellingrath S, Kudielka BM. 2016. Psychobiological Pathways from Work Stress to Reduced Health: Naturalistic and Experimental Studies on the ERI Model In *Work Stress and Health in a Globalized Economy: The Model of Effort-Reward Imbalance*, ed. J Siegrist, M Wahrendorf, pp. 145-70. Cham: Springer International Publishing
- Binder EB, Bradley RG, Liu W, Epstein MP, Deveau TC, et al. 2008. Association of FKBP5 polymorphisms and childhood abuse with risk of posttraumatic stress disorder symptoms in adults. *JAMA* 299: 1291-305
- Binder EB, Salyakina D, Lichtner P, Wochnik GM, Ising M, et al. 2004. Polymorphisms in FKBP5 are associated with increased recurrence of depressive episodes and rapid response to antidepressant treatment. *Nat Genet* 36: 1319-25
- Bodamer OA, Mitterer G, Maurer W, Pollak A, Mueller MW, Schmidt WM. 2006. Evidence for an association between mannose-binding lectin 2 (MBL2) gene polymorphisms and pre-term birth. *Genet Med* 8: 518-24
- Buchmann AF, Holz N, Boecker R, Blomeyer D, Rietschel M, et al. 2014. Moderating role of FKBP5 genotype in the impact of childhood adversity on cortisol stress response during adulthood. *Eur Neuropsychopharmacol* 24: 837-45
- Bunea IM, Szentagotai-Tatar A, Miu AC. 2017. Early-life adversity and cortisol response to social stress: a meta-analysis. *Transl Psychiatry* 7: 1274
- Calkins K, Devaskar SU. 2011. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 41: 158-76
- Campbell J, Ehlert U. 2012. Acute psychosocial stress: does the emotional stress response correspond with physiological responses? *Psychoneuroendocrinology* 37: 1111-34
- Canli T, Lesch KP. 2007. Long story short: the serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nat Neurosci* 10: 1103-9
- Chau CM, Ranger M, Sulistyoningrum D, Devlin AM, Oberlander TF, Grunau RE. 2014. Neonatal pain and COMT Val158Met genotype in relation to serotonin transporter (SLC6A4) promoter methylation in very preterm children at school age. *Front Behav Neurosci* 8: 409
- Chida Y, Hamer M. 2008. Chronic psychosocial factors and acute physiological responses to laboratory-induced stress in healthy populations: a quantitative review of 30 years of investigations. *Psychol Bull* 134: 829-85

- Chrousos GP. 2009. Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol* 5: 374-81
- Contrada R, Baum A. 2010. *The Handbook of Stress Science: Biology, Psychology, and Health*. Springer Publishing Company.
- de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 6: 463-75
- de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. 1999. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 22: 422-6
- de Vente W, van Amsterdam JGC, Olff M, Kamphuis JH, Emmelkamp PMG. 2015. Burnout Is Associated with Reduced Parasympathetic Activity and Reduced HPA Axis Responsiveness, Predominantly in Males. *BioMed Research International* 2015: 431725
- Devlin AM, Brain U, Austin J, Oberlander TF. 2010. Prenatal exposure to maternal depressed mood and the MTHFR C677T variant affect SLC6A4 methylation in infants at birth. *PLoS One* 5: e12201
- Ditzen B, Schmidt S, Strauss B, Nater UM, Ehlert U, Heinrichs M. 2008. Adult attachment and social support interact to reduce psychological but not cortisol responses to stress. *J Psychosom Res* 64: 479-86
- Dogan P, Ozkan H, Koksal N, Oral HB, Bagci O, Guney Varal I. 2020. Mannose-binding lectin gene polymorphism and its effect on short term outcomes in preterm infants. *J Pediatr (Rio J)* 96: 520-26
- Duis J, Cox OH, Ji Y, Seifuddin F, Lee RS, Wang X. 2018. Effect of Genotype and Maternal Affective Disorder on Intronic Methylation of FK506 Binding Protein 5 in Cord Blood DNA. *Front Genet* 9: 648
- Dzwonek AB, Neth OW, Thiebaut R, Gulczynska E, Chilton M, et al. 2008. The role of mannose-binding lectin in susceptibility to infection in preterm neonates. *Pediatr Res* 63: 680-5
- Eddy P, Wertheim EH, Hale MW, Wright BJ. 2018. A Systematic Review and Meta-analysis of the Effort-Reward Imbalance Model of Workplace Stress and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Measures of Stress. *Psychosom Med* 80: 103-13
- Ehli EA, Hu Y, Lengyel-Nelson T, Hudziak JJ, Davies GE. 2012. Identification and functional characterization of three novel alleles for the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Mol Psychiatry* 17: 185-92
- Engert V, Efanov SI, Duchesne A, Vogel S, Corbo V, Pruessner JC. 2013. Differentiating anticipatory from reactive cortisol responses to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 38: 1328-37
- Epel ES, Crosswell AD, Mayer SE, Prather AA, Slavich GM, et al. 2018. More than a feeling: A unified view of stress measurement for population science. *Front Neuroendocrinol* 49: 146-69
- Everson TM, Kaczor K, Makoroff K, Meyers G, Rosado N, et al. 2023. Epigenetic differences in stress response gene FKBP5 among children with abusive vs accidental injuries. *Pediatr Res* 94: 193-99
- Fleming TP, Sun C, Denisenko O, Caetano L, Aljhdali A, et al. 2021. Environmental Exposures around Conception: Developmental Pathways Leading to Lifetime Disease Risk. *Int J Environ Res Public Health* 18
- Foley P, Kirschbaum C. 2010. Human hypothalamus-pituitary-adrenal axis responses to acute psychosocial stress in laboratory settings. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 91-6
- Frakking FN, Brouwer N, Zweers D, Merkus MP, Kuijpers TW, et al. 2006. High prevalence of mannose-binding lectin (MBL) deficiency in premature neonates. *Clin Exp Immunol* 145: 5-12
- Fukunaga H. 2021. Mitochondrial DNA Copy Number and Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Int J Mol Sci* 22



- Garred P, Larsen F, Madsen HO, Koch C. 2003. Mannose-binding lectin deficiency--revisited. *Mol Immunol* 40: 73-84
- Goodman WK, Janson J, Wolf JM. 2017. Meta-analytical assessment of the effects of protocol variations on cortisol responses to the Trier Social Stress Test. *Psychoneuroendocrinology* 80: 26-35
- Grasso DJ, Drury S, Briggs-Gowan M, Johnson A, Ford J, et al. 2020. Adverse childhood experiences, posttraumatic stress, and FKBP5 methylation patterns in postpartum women and their newborn infants. *Psychoneuroendocrinology* 114: 104604
- Harkness KL, Washburn D. 2016. Chapter 40 - Stress Generation In *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior*, ed. G Fink, pp. 331-38. San Diego: Academic Press
- Harrington CT, Lin EI, Olson MT, Eshleman JR. 2013. Fundamentals of pyrosequencing. *Arch Pathol Lab Med* 137: 1296-303
- Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH. 2000. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25: 1-35
- Heinrichs M, Meinlschmidt G, Neumann I, Wagner S, Kirschbaum C, et al. 2001. Effects of suckling on hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychosocial stress in postpartum lactating women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4798-804
- Hellhammer DH, Buchtal J, Gutberlet I, Kirschbaum C. 1997. Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men. *Psychoneuroendocrinology* 22: 643-50
- Herbison CE, Henley D, Marsh J, Atkinson H, Newnham JP, et al. 2016. Characterization and novel analyses of acute stress response patterns in a population-based cohort of young adults: influence of gender, smoking, and BMI. *Stress* 19: 139-50
- Hohne N, Poidinger M, Merz F, Pfister H, Bruckl T, et al. 2014. FKBP5 genotype-dependent DNA methylation and mRNA regulation after psychosocial stress in remitted depression and healthy controls. *Int J Neuropsychopharmacol* 18
- Hostinar CE, Sullivan RM, Gunnar MR. 2014. Psychobiological mechanisms underlying the social buffering of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: a review of animal models and human studies across development. *Psychol Bull* 140: 256-82
- Houtepen LC, Boks MP, Kahn RS, Joels M, Vinkers CH. 2015. Antipsychotic use is associated with a blunted cortisol stress response: a study in euthymic bipolar disorder patients and their unaffected siblings. *Eur Neuropsychopharmacol* 25: 77-84
- Houtepen LC, Vinkers CH, Carrillo-Roa T, Hiemstra M, van Lier PA, et al. 2016. Genome-wide DNA methylation levels and altered cortisol stress reactivity following childhood trauma in humans. *Nat Commun* 7: 10967
- Hu XZ, Lipsky RH, Zhu G, Akhtar LA, Taubman J, et al. 2006. Serotonin transporter promoter gain-of-function genotypes are linked to obsessive-compulsive disorder. *Am J Hum Genet* 78: 815-26
- Hunter AL, Minnis H, Wilson P. 2011. Altered stress responses in children exposed to early adversity: a systematic review of salivary cortisol studies. *Stress* 14: 614-26
- Hunter RG, Gagnidze K, McEwen BS, Pfaff DW. 2015. Stress and the dynamic genome: Steroids, epigenetics, and the transposome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 6828-33
- Ikegame T, Hidaka Y, Nakachi Y, Murata Y, Watanabe R, et al. 2021. Identification and functional characterization of the extremely long allele of the serotonin transporter-linked polymorphic region. *Transl Psychiatry* 11: 119
- Incollingo Rodriguez AC, Epel ES, White ML, Standen EC, Seckl JR, Tomiyama AJ. 2015. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and cortisol activity in obesity: A systematic review. *Psychoneuroendocrinology* 62: 301-18
- Ising M, Depping AM, Siebertz A, Lucae S, Unschuld PG, et al. 2008. Polymorphisms in the FKBP5 gene region modulate recovery from psychosocial stress in healthy controls. *Eur J Neurosci* 28: 389-98

- Isles AR. 2015. Neural and behavioral epigenetics; what it is, and what is hype. *Genes Brain Behav* 14: 64-72
- Iurescia S, Seripa D, Rinaldi M. 2016. Role of the 5-HTTLPR and SNP Promoter Polymorphisms on Serotonin Transporter Gene Expression: a Closer Look at Genetic Architecture and In Vitro Functional Studies of Common and Uncommon Allelic Variants. *Mol Neurobiol* 53: 5510-26
- Jonsson P, Osterberg K, Wallergard M, Hansen AM, Garde AH, et al. 2015. Exhaustion-related changes in cardiovascular and cortisol reactivity to acute psychosocial stress. *Physiol Behav* 151: 327-37
- Kajantie E, Raikkonen K. 2010. Early life predictors of the physiological stress response later in life. *Neurosci Biobehav Rev* 35: 23-32
- Kirschbaum C, Klauer T, Filipp SH, Hellhammer DH. 1995. Sex-specific effects of social support on cortisol and subjective responses to acute psychological stress. *Psychosom Med* 57: 23-31
- Kirschbaum C, Pirke K-M, Hellhammer DH. 2008. The 'Trier Social Stress Test' – A Tool for Investigating Psychobiological Stress Responses in a Laboratory Setting. *Neuropsychobiology* 28: 76-81
- Klaperski S, von Dawans B, Heinrichs M, Fuchs R. 2013. Does the level of physical exercise affect physiological and psychological responses to psychosocial stress in women? *Psychology of Sport and Exercise* 14: 266-74
- Klengel T, Mehta D, Anacker C, Rex-Haffner M, Pruessner JC, et al. 2013. Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene-childhood trauma interactions. *Nat Neurosci* 16: 33-41
- Koroglu OA, Onay H, Erdemir G, Yalaz M, Cakmak B, et al. 2010. Mannose-binding lectin gene polymorphism and early neonatal outcome in preterm infants. *Neonatology* 98: 305-12
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125
- Kudielka BM, Hellhammer DH, Wust S. 2009. Why do we respond so differently? Reviewing determinants of human salivary cortisol responses to challenge. *Psychoneuroendocrinology* 34: 2-18
- Kudielka BM, Schommer NC, Hellhammer DH, Kirschbaum C. 2004. Acute HPA axis responses, heart rate, and mood changes to psychosocial stress (TSST) in humans at different times of day. *Psychoneuroendocrinology* 29: 983-92
- Kudielka BM, von Kanel R, Preckel D, Zraggen L, Mischler K, Fischer JE. 2006. Exhaustion is associated with reduced habituation of free cortisol responses to repeated acute psychosocial stress. *Biol Psychol* 72: 147-53
- Kumsta R, Chen FS, Pape HC, Heinrichs M. 2013. Neuropeptide S receptor gene is associated with cortisol responses to social stress in humans. *Biol Psychol* 93: 304-7
- Lahat A, van Lieshout RJ, Mathewson KJ, Mackillop J, Saigal S, et al. 2017. Extremely low birth weight babies grown up: Gene-environment interaction predicts internalizing problems in the third and fourth decades of life. *Dev Psychopathol* 29: 837-43
- Lautarescu A, Pecheva D, Nosarti C, Nihouarn J, Zhang H, et al. 2020. Maternal Prenatal Stress Is Associated With Altered Uncinate Fasciculus Microstructure in Premature Neonates. *Biol Psychiatry* 87: 559-69
- Lennartsson AK, Sjors A, Wahrborg P, Ljung T, Jonsdottir IH. 2015. Burnout and Hypocortisolism - A Matter of Severity? A Study on ACTH and Cortisol Responses to Acute Psychosocial Stress. *Front Psychiatry* 6: 8
- Lesch K-P. 2011. When the Serotonin Transporter Gene Meets Adversity: The Contribution of Animal Models to Understanding Epigenetic Mechanisms in Affective Disorders and

- Resilience In *Molecular and Functional Models in Neuropsychiatry*, ed. JJ Hagan, pp. 251-80. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, et al. 1996. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science* 274: 1527-31
- Luijk MP, Velders FP, Tharner A, van Ijzendoorn MH, Bakermans-Kranenburg MJ, et al. 2010. FKBP5 and resistant attachment predict cortisol reactivity in infants: gene-environment interaction. *Psychoneuroendocrinology* 35: 1454-61
- Luo J, Zhang B, Cao M, Roberts BW. 2023. The Stressful Personality: A Meta-Analytical Review of the Relation Between Personality and Stress. *Pers Soc Psychol Rev* 27: 128-94
- Mahon PB, Zandi PP, Potash JB, Nestadt G, Wand GS. 2013. Genetic association of FKBP5 and CRHR1 with cortisol response to acute psychosocial stress in healthy adults. *Psychopharmacology (Berl)* 227: 231-41
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, et al. 2009. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747-53
- McCormick MC. 1985. The contribution of low birth weight to infant mortality and childhood morbidity. *N Engl J Med* 312: 82-90
- McEwen BS. 1998. Protective and damaging effects of stress mediators. *N Engl J Med* 338: 171-9
- McEwen BS. 2005. Stressed or stressed out: what is the difference? *J Psychiatry Neurosci* 30: 315-8
- McGowan PO, Matthews SG. 2018. Prenatal Stress, Glucocorticoids, and Developmental Programming of the Stress Response. *Endocrinology* 159: 69-82
- Mendoza-Ortega JA, Reyes-Munoz E, Nava-Salazar S, Rodriguez-Martinez S, Parra-Hernandez SB, et al. 2021. Mitochondrial DNA Copy Number Adaptation as a Biological Response Derived from an Earthquake at Intrauterine Stage. *Int J Environ Res Public Health* 18
- Mifsud KR, Gutierrez-Mecinas M, Trollope AF, Collins A, Saunderson EA, Reul JM. 2011. Epigenetic mechanisms in stress and adaptation. *Brain Behav Immun* 25: 1305-15
- Mifsud KR, Reul J. 2018. Mineralocorticoid and glucocorticoid receptor-mediated control of genomic responses to stress in the brain. *Stress* 21: 389-402
- Miller GE, Chen E, Zhou ES. 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull* 133: 25-45
- Miller GE, Culhane J, Grobman W, Simhan H, Williamson DE, et al. 2017. Mothers' childhood hardship forecasts adverse pregnancy outcomes: Role of inflammatory, lifestyle, and psychosocial pathways. *Brain Behav Immun* 65: 11-19
- Miller R, Wankerl M, Stalder T, Kirschbaum C, Alexander N. 2013. The serotonin transporter gene-linked polymorphic region (5-HTTLPR) and cortisol stress reactivity: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 18: 1018-24
- Monroe SM. 2008. Modern approaches to conceptualizing and measuring human life stress. *Annu Rev Clin Psychol* 4: 33-52
- Montirosso R, Provenzi L, Fumagalli M, Sirgiovanni I, Giorda R, et al. 2016. Serotonin Transporter Gene (SLC6A4) Methylation Associates With Neonatal Intensive Care Unit Stay and 3-Month-Old Temperament in Preterm Infants. *Child Dev* 87: 38-48
- Moren C, Hernandez S, Guitart-Mampel M, Garrabou G. 2014. Mitochondrial toxicity in human pregnancy: an update on clinical and experimental approaches in the last 10 years. *Int J Environ Res Public Health* 11: 9897-918
- Mullis KB. 1990. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)* 48: 579-82

- Nesse RM, Young EA. 2000. Evolutionary origins and functions of the stress response. *Encyclopedia of stress 2*: 79-84
- Nixon M, Andrew R, Chapman KE. 2013. It takes two to tango: dimerisation of glucocorticoid receptor and its anti-inflammatory functions. *Steroids* 78: 59-68
- Oitzl MS, Champagne DL, van der Veen R, de Kloet ER. 2010. Brain development under stress: hypotheses of glucocorticoid actions revisited. *Neurosci Biobehav Rev* 34: 853-66
- Oswald LM, Zandi P, Nestadt G, Potash JB, Kalaydjian AE, Wand GS. 2006. Relationship between cortisol responses to stress and personality. *Neuropsychopharmacology* 31: 1583-91
- Ozkan H, Koksall N, Cetinkaya M, Kilic S, Celebi S, et al. 2012. Serum mannose-binding lectin (MBL) gene polymorphism and low MBL levels are associated with neonatal sepsis and pneumonia. *J Perinatol* 32: 210-7
- Papadopoulos AS, Cleare AJ. 2011. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysfunction in chronic fatigue syndrome. *Nat Rev Endocrinol* 8: 22-32
- Papadopoulou Z, Vlaikou AM, Theodoridou D, Markopoulos GS, Tsoni K, et al. 2019. Stressful Newborn Memories: Pre-Conceptual, In Utero, and Postnatal Events. *Front Psychiatry* 10: 220
- Paquette AG, Lester BM, Koestler DC, Lesseur C, Armstrong DA, Marsit CJ. 2014. Placental FKBP5 genetic and epigenetic variation is associated with infant neurobehavioral outcomes in the RICHS cohort. *PLoS One* 9: e104913
- Philibert R, Madan A, Andersen A, Cadoret R, Packer H, Sandhu H. 2007. Serotonin transporter mRNA levels are associated with the methylation of an upstream CpG island. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B: 101-5
- Presman DM, Ganguly S, Schiltz RL, Johnson TA, Karpova TS, Hager GL. 2016. DNA binding triggers tetramerization of the glucocorticoid receptor in live cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 8236-41
- Provencal N, Binder EB. 2015. The effects of early life stress on the epigenome: From the womb to adulthood and even before. *Exp Neurol* 268: 10-20
- Provenzi L, Fumagalli M, Sirgiovanni I, Giorda R, Pozzoli U, et al. 2015. Pain-related stress during the Neonatal Intensive Care Unit stay and SLC6A4 methylation in very preterm infants. *Front Behav Neurosci* 9: 99
- Quinn JA, Munoz FM, Gonik B, Frau L, Cutland C, et al. 2016. Preterm birth: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of immunisation safety data. *Vaccine* 34: 6047-56
- Rein T. 2016. FK506 binding protein 51 integrates pathways of adaptation: FKBP51 shapes the reactivity to environmental change. *Bioessays* 38: 894-902
- Rimmele U, Seiler R, Marti B, Wirtz PH, Ehler U, Heinrichs M. 2009. The level of physical activity affects adrenal and cardiovascular reactivity to psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 34: 190-98
- Roberts RJ. 1976. Restriction endonucleases. *CRC Crit Rev Biochem* 4: 123-64
- Roger AJ, Munoz-Gomez SA, Kamikawa R. 2017. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol* 27: R1177-R92
- Rohleder N, Kirschbaum C. 2006. The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in habitual smokers. *Int J Psychophysiol* 59: 236-43
- Rooney KL, Domar AD. 2018. The relationship between stress and infertility. *Dialogues Clin Neurosci* 20: 41-47
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-4
- Salleh MR. 2008. Life event, stress and illness. *Malays J Med Sci* 15: 9-18

- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saul A, Taylor B, Simpson S, Jr., Ponsonby AL, Blizzard L, et al. 2019. Polymorphism in the serotonin transporter gene polymorphisms ( 5-HTTLPR) modifies the association between significant life events and depression in people with multiple sclerosis. *Mult Scler* 25: 848-55
- Scammell JG, Denny WB, Valentine DL, Smith DF. 2001. Overexpression of the FK506-Binding Immunophilin FKBP51 Is the Common Cause of Glucocorticoid Resistance in Three New World Primates. *General and Comparative Endocrinology* 124: 152-65
- Selye H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J* 1: 1383-92
- Serpeloni F, Radtke KM, Hecker T, Elbert T. 2016. Epigenetic Biomarkers of Prenatal Maternal Stress In *Epigenetics and Neuroendocrinology : Clinical Focus on Psychiatry, Volume 2*, ed. D Spengler, E Binder, pp. 177-96. Cham: Springer International Publishing
- Serretti A, Calati R, Mandelli L, De Ronchi D. 2006. Serotonin transporter gene variants and behavior: a comprehensive review. *Curr Drug Targets* 7: 1659-69
- Smith TW. 2006. Personality as Risk and Resilience in Physical Health. *Current Directions in Psychological Science* 15: 227-31
- Sosnowski MJ, Brosnan SF. 2023. Under pressure: the interaction between high-stakes contexts and individual differences in decision-making in humans and non-human species. *Anim Cogn* 26: 1103-17
- Speletas M, Gounaris A, Sevdali E, Kompoti M, Konstantinidi K, et al. 2015. MBL2 genotypes and their associations with MBL levels and NICU morbidity in a cohort of Greek neonates. *J Immunol Res* 2015: 478412
- Steiger H, Richardson J, Joober R, Gauvin L, Israel M, et al. 2007. The 5HTTLPR polymorphism, prior maltreatment and dramatic-erratic personality manifestations in women with bulimic syndromes. *J Psychiatry Neurosci* 32: 354-62
- Stein A, Campbell EA, Day A, McPherson K, Cooper PJ. 1987. Social adversity, low birth weight, and preterm delivery. *Br Med J (Clin Res Ed)* 295: 291-3
- Strahler J, Fuchs R, Nater UM, Klaperski S. 2016. Impact of physical fitness on salivary stress markers in sedentary to low-active young to middle-aged men. *Psychoneuroendocrinology* 68: 14-9
- Strahler J, Skoluda N, Kappert MB, Nater UM. 2017. Simultaneous measurement of salivary cortisol and alpha-amylase: Application and recommendations. *Neurosci Biobehav Rev* 83: 657-77
- Stratakis CA, Chrousos GP. 1995. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann N Y Acad Sci* 771: 1-18
- Stroud LR, Papandonatos GD, D'Angelo CM, Brush B, Lloyd-Richardson EE. 2017. Sex differences in biological response to peer rejection and performance challenge across development: A pilot study. *Physiol Behav* 169: 224-33
- Stroud LR, Salovey P, Epel ES. 2002. Sex differences in stress responses: social rejection versus achievement stress. *Biol Psychiatry* 52: 318-27
- Turecki G. 2016. Epigenetic Biomarkers for Early-Life Adversity In *Epigenetics and Neuroendocrinology : Clinical Focus on Psychiatry, Volume 2*, ed. D Spengler, E Binder, pp. 159-75. Cham: Springer International Publishing
- Turner MW. 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 40: 423-9
- Tuschy B, Berlit S, Stutzer P, Lis S, Schmahl C, et al. 2018. Evaluation of psychosocial and biological parameters in women seeking for a caesarean section and women who are aiming for vaginal delivery: a cross-sectional study. *Arch Gynecol Obstet* 297: 897-905

- Uher R. 2014. Gene-environment interactions in common mental disorders: an update and strategy for a genome-wide search. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol* 49: 3-14
- van der Knaap LJ, Oldehinkel AJ, Verhulst FC, van Oort FV, Riese H. 2015. Glucocorticoid receptor gene methylation and HPA-axis regulation in adolescents. The TRAILS study. *Psychoneuroendocrinology* 58: 46-50
- Van Hedger K, Bershad AK, de Wit H. 2017. Pharmacological challenge studies with acute psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 85: 123-33
- Wadhwa PD, Buss C, Entringer S, Swanson JM. 2009. Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med* 27: 358-68
- Wang Q, Shelton RC, Dwivedi Y. 2018. Interaction between early-life stress and FKBP5 gene variants in major depressive disorder and post-traumatic stress disorder: A systematic review and meta-analysis. *J Affect Disord* 225: 422-28
- Watkins WJ, Kotecha SJ, Kotecha S. 2016. All-Cause Mortality of Low Birthweight Infants in Infancy, Childhood, and Adolescence: Population Study of England and Wales. *PLoS Med* 13: e1002018
- Waxman J, Van Lieshout RJ, Schmidt LA. 2014. Early adversity and mental health: linking extremely low birth weight, emotion regulation, and internalizing disorders. *Curr Pediatr Rev* 10: 208-15
- Weckesser LJ, Plessow F, Pilhatsch M, Muehlhan M, Kirschbaum C, Miller R. 2014. Do venepuncture procedures induce cortisol responses? A review, study, and synthesis for stress research. *Psychoneuroendocrinology* 46: 88-99
- WHO. 2022. International classification of diseases, eleventh revision (ICD-11). World Health Organization Geneva
- Wochnik GM, Ruegg J, Abel GA, Schmidt U, Holsboer F, Rein T. 2005. FK506-binding proteins 51 and 52 differentially regulate dynein interaction and nuclear translocation of the glucocorticoid receptor in mammalian cells. *J Biol Chem* 280: 4609-16
- Wust S, Federenko IS, van Rossum EF, Koper JW, Hellhammer DH. 2005. Habituation of cortisol responses to repeated psychosocial stress-further characterization and impact of genetic factors. *Psychoneuroendocrinology* 30: 199-211
- Zankert S, Bellingrath S, Wust S, Kudielka BM. 2019. HPA axis responses to psychological challenge linking stress and disease: What do we know on sources of intra- and interindividual variability? *Psychoneuroendocrinology* 105: 86-97
- Zannas AS, Binder EB. 2014. Gene-environment interactions at the FKBP5 locus: sensitive periods, mechanisms and pleiotropism. *Genes Brain Behav* 13: 25-37
- Zorn JV, Schur RR, Boks MP, Kahn RS, Joels M, Vinkers CH. 2017. Cortisol stress reactivity across psychiatric disorders: A systematic review and meta-analysis. *Psychoneuroendocrinology* 77: 25-36

### Ελληνική

- Παπαδοπούλου Ζ. (2021). Μικρό βάρος γέννηση, ενδομήτριο στρες και πρώιμη λοίμωξη: γενετικοί και περιβαλλοντικοί προδιαθεσικοί παράγοντες. Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Σπαθή Α.-Ε. (2022). Πολυμορφισμοί γονιδίων του άξονα του στρες και προδιάθεση για προωρότητα και μικρό βάρος γέννησης. Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.